

パラコート類縁化合物の
酸化還元特性に関する検討

光本篤史

パラコート類縁化合物の 酸化還元特性に関する検討

目次	1
1. 緒言	2
2. 実験的	2
2.1. 試薬と装置	2
2.2. 測定法	2
2.3. 測定結果	2
2.4. 結果と考察	2
2.5. 結論	2
参考文献	2
謝辞	2
著者略歴	2
光本篤史	21

目次

	<i>page</i>
序章	3
1) 酸素と活性酸素	3
2) バラコートと活性酸素増産剤	4
3) 酸化還元電位	6
4) 抗体触媒 (Catalytic antibodies)	7
第1章 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP ⁺) 誘導体の活性酸素増産作用	10
第1節 MPP ⁺ 誘導体の合成	12
第2節 MPP ⁺ 誘導体の酸化還元電位	15
第3節 MPP ⁺ 誘導体の活性酸素増産能	18
第4節 MPP ⁺ 誘導体の大腸菌に対する増殖阻害活性	23
第5節 MPP ⁺ 誘導体の大腸菌に対する致死活性	25
第6節 結論と考察	26
第2章 MPP ⁺ 誘導体の大腸菌 (B 株, SR-9) に対する作用と呼吸鎖阻害活性	34
第1節 MPP ⁺ 誘導体の活性酸素増産能	35
第2節 MPP ⁺ 誘導体の大腸菌に対する増殖阻害活性	36
第3節 MPP ⁺ 誘導体の呼吸鎖阻害活性	37
第4節 結論と考察	47
第3章 アルキル鎖長の異なるバラコート類縁化合物の酸素毒性	50
第1節 C ₁ C _n 化合物の合成	51
第2節 C ₁ C _n 化合物の酸化還元電位	52
第3節 C ₁ C _n 化合物の活性酸素増産能	61
第4節 C ₁ C _n 化合物の大腸菌に対する増殖阻害活性	63
第5節 C ₁ C _n 化合物の大腸菌に対する致死活性	68

第6節 結論と考察	69
第4章 バラコート類緑化合物の酸化還元特性に与える	
抗バラコート抗体の効果	73
第1節 抗バラコート抗体調製のためのコンセプト	74
第2節 ハプテンのデザインと合成	76
第3節 バラコートを認識するモノクローナル抗体の調製	78
第4節 抗バラコート抗体の認識様式	80
第5節 バラコート類緑化合物の酸化還元特性に与える	
抗バラコート抗体の効果	86
第6節 結論と考察	89
第5章 種々の化学反応にもたらす抗バラコート抗体の効果に関する試み	91
第1節 電子伝達系に対する効果	92
第2節 加水分解反応に対する効果	94
第3節 benzaldehyde 生成反応に対する効果	96
第4節 芳香化型中間体を經由する脱酢酸反応に対する効果	98
総括	100
Materials and Methods	101
References	128
謝辞	136

序章

1) 酸素と活性酸素¹⁻⁴⁾

酸素分子の1電子還元体である superoxide ($O_2^{\cdot-}$)をはじめ、2電子還元体の過酸化水素 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、3電子還元体の hydroxyl radical ($\cdot OH$)、そして酸素の励起状態である1重項酸素 (1O_2)を含め、これらの分子種は「活性酸素」と呼ばれている。

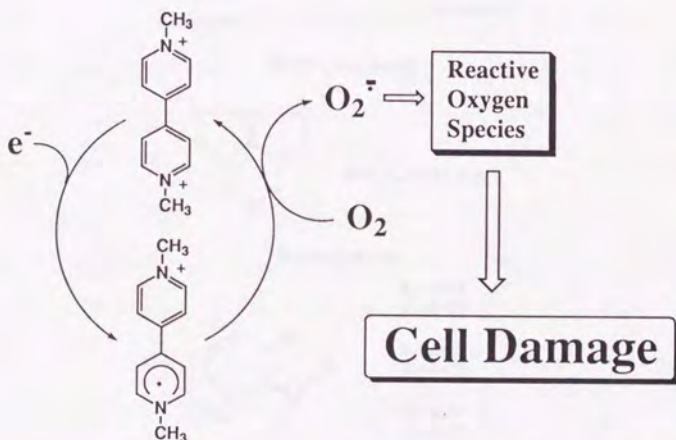
好氣的生物にとって酸素は、呼吸における最終的な電子受容体として、また酸化酵素や酸素添加酵素の基質として重要な役割を担っている。分子状酸素は通常3重項状態で存在し、主に1重項状態の物質からなる生体の構成成分とは反応性に乏しく、生体内で安定に存在する。ところが不必要に還元されたり、励起され反応性に富んだ活性酸素種になると、生体内の標的分子(タンパク質、核酸、脂質)を攻撃し、生体を酸化的ストレスに脅かすことになる。いわゆる酸素毒性が発揮される。炎症や発癌をはじめ種々の疾患や老化現象にもこれら活性酸素種が関与することが知られている。生体内に存在する superoxide dismutase (SOD) や catalase などの活性酸素消去酵素や、アスコルビン酸、トコフェロールなどのビタミン類は、抗酸化作用を示し通常の酸化的ストレスから生体を防御している。このバランスが崩れ酸化的ストレスが過剰になると疾患にいたると考えられている。

生体内での活性酸素種生成は必ずしも悪く働くとは限らない。例えば、生体に混入した異物を排除するために働く白血球、マクロファージなどは、食作用において種々の活性酸素種を産生して殺菌、消化を行う。また、キノン系制癌剤の制癌活性やバラコートによる除草作用は、活性酸素種の生成を伴って活性を発現する。これらは実際の薬物として大変利用価値の高いものである。こうしてみると、「活性酸素種の生成と消去を意のままに制御すること」こそが、生体を種々の疾患から守る重要な鍵であり、我々に与えられた課題であることが分かる。

2) パラコートと 活性酸素増産剤

パラコート (methyl viologen, MV^{2+} , paraquat, PQ^{2+}) はその電子的性質から、古くから電子伝達系の上流での電子受容体色素として生化学的に用いられてきた⁵⁾。また化学的にも人工光合成を構築する試みや電極反応の mediator として頻繁に用いられている^{6,7)}。パラコートの除草効果は極めて高く農業として一斉に広まったが、誤用や乱用による人に対する毒性も強く、現在では他の農業に取って代わられている⁵⁾。

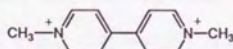
パラコート⁸⁻¹⁷⁾は活性酸素増産剤として最も良く研究されている化合物の一つであり、その活性酸素産生と作用発現のメカニズムは Scheme 0-1 のように考えられている。すなわち、生体内で1電子還元されて生じたパラコートカチオンラジカルが酸素によって再酸化されると同時に $O_2^{\cdot-}$ を産生し、この $O_2^{\cdot-}$ やそれから派生する活性酸素種が細胞障害を引き起こすというものである。Chart 0-1 に示した4級塩化合物⁸⁻¹⁷⁾、キノン類¹⁸⁻²¹⁾、ヘテロペンタレン類^{22,23)}などは、このような酸化還元サイクルによって活



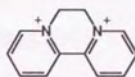
Scheme 0-1. Mechanism of Paraquat Toxicity

性酸素種を産生することが知られている。また、当教室でもヘテロペンタレン類 (24,25) やベンゾフラザン類 (26-28) が活性酸素増産作用を持ち、大腸菌に対し酸素依存的な増殖阻害効果を発揮することを明らかにしてきた。活性酸素増産作用を示す化合物の中には生物活性を示すものが多く (29)、新たな活性酸素増産剤を見出し、そのメカニズムを解明することは重要であると考えられる。

Quaternary Salts (Herbicide)

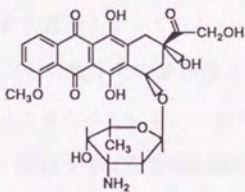


Paraquat

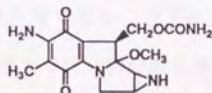


Diquat

Quinones (Cancerocidal substance)

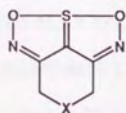


Adriamycin



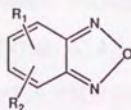
Mitomycin C

Heteropentalenes



X=CH₂, S, SO, SO₂

Benzofurazans



R₁=4-CN
R₂=5-CN

R₁=4-CN
R₂=7-CN

R₁=4-Br
R₂=6-CN

Chart 0-1. Redox-active Compounds

3) 酸化還元電位^{30,31)}

電極反応、化学的酸化還元反応などに見られる電子の流れを規定しているものは物質の酸化還元電位である。すなわち酸化還元電位がマイナス側のものからプラス側のものに電子がながれる。言い換えれば酸化還元電位がマイナス側のものほど還元力が強く、酸化還元電位がプラス側のものほど酸化力が強い。呼吸鎖電子伝達系や光合成系など生命活動に見られる電子の流れも酸化還元電位に依存しているが、分子間での電子の授受は極めて秩序だっている。これらの系では酸化還元電位差のギャップを埋めるように電子伝達体とならび、スムーズな電子の流れと効率の良いエネルギーの獲得を可能にしている。この電子伝達における特異性はそこに介在するタンパク質が担っており、タンパク質による認識が重要な要因となっている。

化合物の酸化還元電位は電子との親和性を示す尺度であり、分子軌道の最低空軌道(LUMO)と相関があると言われている。一定の条件下で化合物の酸化還元電位は変わらないが、周囲の環境が変化すると化合物の酸化還元電位も変化する。例えば溶媒の効果が挙げられる。パラコート[®]の酸化還元電位は有機溶媒中で -450 mV (vs. SCE) であるが、水中では -680 mV (vs. SCE) となる。また酸素の酸化還元電位は有機溶媒中では約 -0.9 V (vs. SCE) であるが、水中では約 -0.3 V (vs. SCE) となる。これら溶媒効果は化合物の1電子還元による極性の変化と溶媒の極性とで説明される。すなわち、1電子還元されることで極性が下がる化合物は、その1電子還元体が極性の低い溶媒中で安定化されるため有機溶媒中で還元されやすい。逆に1電子還元されることで極性が上がる化合物は、その1電子還元体が極性の高い溶媒中で安定化されるため水中で還元されやすい。また、鉄錯体の酸化還元電位は配位子の違いによって大きく変化する(Table 0-1)。こうした活性中心を取り巻く環境による酸化還元電位の変化は酸化還元特性をもつ化合物がタンパク質中に取り込まれた際に、その環境に応じて異なる酸化還元特性を示すと考えられる。電子伝達系の構成成分の中には、同じヘムを内包しながらも、異なる酸化還元電位を示

サシトクロム成分がある。生体はこれら分子種の酸化還元特性を有効に利用しているが、ここで見られる酸化還元特性の違いはタンパク質の作る「環境」の違いとして説明されている。このタンパク質の作る「環境」とは一体どのようなものなのか、またその「環境」の違いによって化合物の酸化還元電位はどの程度変化するものなのか、興味もたれる問題である。

Table 0-1 Redox Potentials¹⁾ of Various Fe³⁺/Fe²⁺ System

reaction system	E _{1/2} (V vs. NHE)
[Fe(phen) ₃] ³⁺ /[Fe(phen) ₃] ²⁺	1.06
Fe ³⁺ _{aq} /Fe ²⁺ _{aq}	0.77
[FeF ₆] ³⁻ /[Fe ²⁺ +6F ⁻]	0.40
[Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	0.36
[Fe(edta)] ⁻ /[Fe(edta)] ²⁻	0.12
[Fe(C ₂ O ₄) ₃] ³⁻ /([Fe(C ₂ O ₄) ₂] ²⁻ +C ₂ O ₄ ²⁻)	0.02

¹⁾according to ref. 30

phen; 1,10-phenanthroline

edta; ethylenediaminetetraacetate ion

4) 抗体触媒 (Catalytic antibodies)

人工酵素の創製は、未知の酵素による作用機序の解明や合成化学的利用、また代替酵素等による医薬への応用と多方面にわたる目的を含み、有機化学者による大いなる夢の1つである。1986年にモノクローナル抗体がエステルの加水分解反応を触媒したという報告が Schultz³²⁾と Lerner³³⁾の2つのグループによりなされ、抗体触媒 (Catalytic antibodies) という今迄の人工酵素の概念を大幅に上回る "tailor-made enzyme" の可能性を示す、1つの新しい分野を築く発端となった。

抗体触媒の概念はもとを正せば、約50年前の Pauling のコメントに始まる。Pauling は「酵素は基質そのものではなく、反応の遷移状態を認識し、遷移状態を安定化することによって化学反応を促進する」と述べた³⁴⁾。これを受けて1969年に Jencks は「遷移状態を安定に模倣する化合物があれば、それをハプテンとして免役し得られた抗体は

その反応の遷移状態を安定化し化学反応を促進するだろう」と述べている 35)。すなわちここに抗体触媒創製のための戦略が既に確立されていたのである。1980年代になって、モノクローナル抗体の大量調製技術が一般化してくると、それまで生化学的に用いられてきた抗体を上記の概念に当てはめる試みが可能になった。その結果、現在の抗体触媒の成功に見事に結び付いたのである。

抗体触媒^{36,37)}は Schultz と Lerner の 2つのグループを中心に展開されてきたが、初期のエステル加水分解に始まり、転移反応、脱離反応、酸化還元反応などモノクローナル抗体の司る反応例は 1995年1月現在、約 30種程度、報告例は 100報を越えるほどになってきた。抗体触媒調製のための戦略も当初の「遷移状態の安定化 (transition-state stabilization)」だけでなく、抗原抗体反応で見られる静電的相互作用を巧みに利用し抗体側のアミノ酸残基を反応点とする方法 (bait and switch)³⁸⁻⁴⁰⁾、entropy trap 法⁴¹⁻⁴⁴⁾、medium effect 法⁴⁵⁾等も提唱されてきた。また天然の酵素に見られるようにビタミンなどの補酵素や金属イオン等の補因子の活性を利用した試みもなされている。さらにはタンパク質工学の手法を取り入れ、免疫過程を経ずに抗体を得る方法^{46,47)}や computer design による活性部位の構築などの試み⁴⁸⁻⁵⁰⁾もなされるようになった。

今までに抗体触媒から得られた結果をまとめると応用可能なものは次の3点が挙げられる。1つ目は有機合成化学的利用である。生体内で起こることの知られていない Diels-Alder 反応を進行させることもできるし (Diels-Aldrase)⁵¹⁻⁵³⁾、化学的には 5員環生成に向かう閉環反応を、抗体の認識力で 6員環生成へと変換することもできる^{54,55)}。また抗体がタンパク質であり不斉をも見分けることから、抗体触媒の大きな利点として不斉選択的反応を高い不斉収率で実現することが可能である⁵⁶⁻⁵⁸⁾。さらに、生成物を 86% e.e. の不斉収率で gram-scale で得ることに成功している⁵⁹⁾。2つ目は酵素の作用機序に対するアプローチである。chorismate mutase という酵素の中間体を模倣していると考えられていた阻害剤を用いて得られた抗体触媒と天然の chorismate mutase とを X線解析の結果を用い、認識部位を比較することでその違いを明らかにし、活性の上昇を予

測する試みや新たな阻害剤の構築などを示唆する結果を得ている 60)。3つ目は医薬への応用である。細胞レベルでの結果ではあるが、抗体触媒の添加により prodrug を活性化し本来の効果を引き出すことにも成功している (61,62)。またペプチド加水分解活性を持つ自己抗体が見いだされており、その病理的意義を含めて検討されている (63,64)。これらの結果は、モノクローナル抗体の新たな応用性を十分な可能性をもって示している。

逆に抗体触媒の欠点あるいは限界について考えてみると、次のような点が挙げられると思う。抗体はあらゆる分子に対し認識することが可能であり、この認識力が触媒作用を起こす引き金となるが、反応に関与しない部分に対しても強く認識するため、抗体触媒の行う反応では頻繁に生成物阻害が見られる。そのため十分な回転数が得られず、このことは有機合成的応用には不利である。また、基質とヘムなどの補酵素を同時に認識させ部位特異的の反応を行わせることや、2分子結合形成反応などはあまり得意ではない。これは抗体の認識部位の表面積は $800-1000 \text{ \AA}^2$ 程度であるが、多分子間反応を行うのに十分な場がないものと考えられる。以上のような点に考慮しながらハプテンのデザインに工夫を施し、新たな抗体触媒のストラテジーの開発及び抗体化学における理解の進歩によって、これまでより優れた人工酵素の創製が可能になると考えられる。

以上、モノクローナル抗体に酵素活性を付与する試みについて抗体触媒という観点からの現状を概観したが、抗体を単に免疫現象の産物として捉えるのみならず、化学的なモノクローナル抗体の利用はタンパク質によるリガンド認識の解明や、付加価値の高い化合物の創製という意味において、格好のツールとなると考えられる。

第1章

1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) 誘導体の 活性酸素増産作用⁶⁵⁾

新たな活性酸素増産剤の開発とその作用機序の解明を目的として、バラコートとの構造類似性から 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) という 4 級塩化合物に着目した (Chart 1-1)。MPP⁺ とはパーキンソン病様症状を引き起こすことで知られる 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の活性代謝物として見いだされた化合物である (Scheme 1-1)^{66,67)}。その活性発現にはむしろ活性酸素種は関与していないというのが定説である⁶⁷⁻⁶⁹⁾。しかしその構造が極めてバラコートに類似していることと、MPP⁺ の 1 電子還元体である MPP[•] が酸素と $3.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速度で反応すること⁷⁰⁾ から、MPP⁺ はバラコート同様活性酸素増産剤として機能しうるのではないかと考えた。その際化合物の酸化還元電位の違いが注目された⁶⁷⁾ ので (PQ²⁺; $E_{1/2} = -455 \text{ mV}$ (vs. SCE), MPP⁺; $E_{1/2} = -1190 \text{ mV}$ (vs. SCE))、MPP⁺ のフェニル基に種々の置換基を導入し、その電子的性質の変化と活性酸素増産能との関わりについて調べた。また酸素依存的な生物活性を示すかどうかについても大腸菌を用いて検討した。

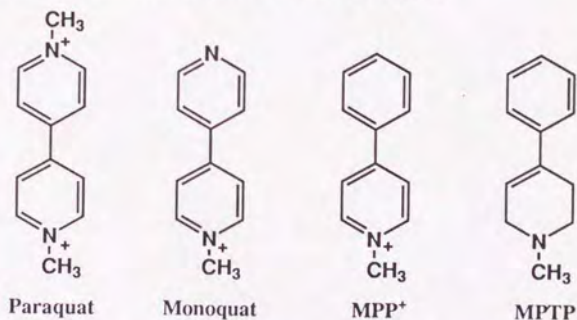
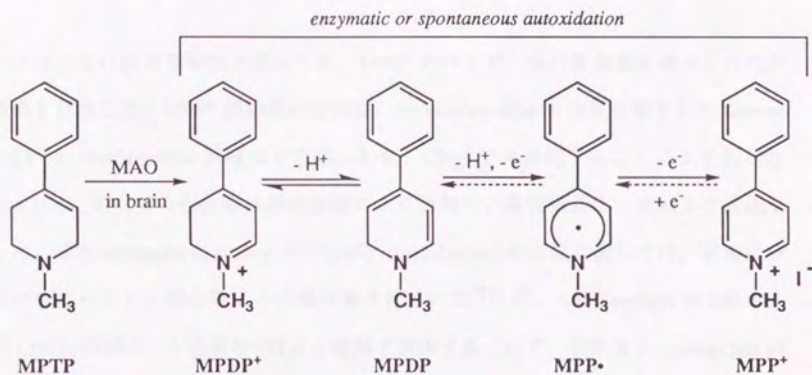


Chart 1-1. Paraquat and its Analogous Compounds



Scheme 1-1. Toxic Bioactivation of MPTP

(modified according to ref. 67)

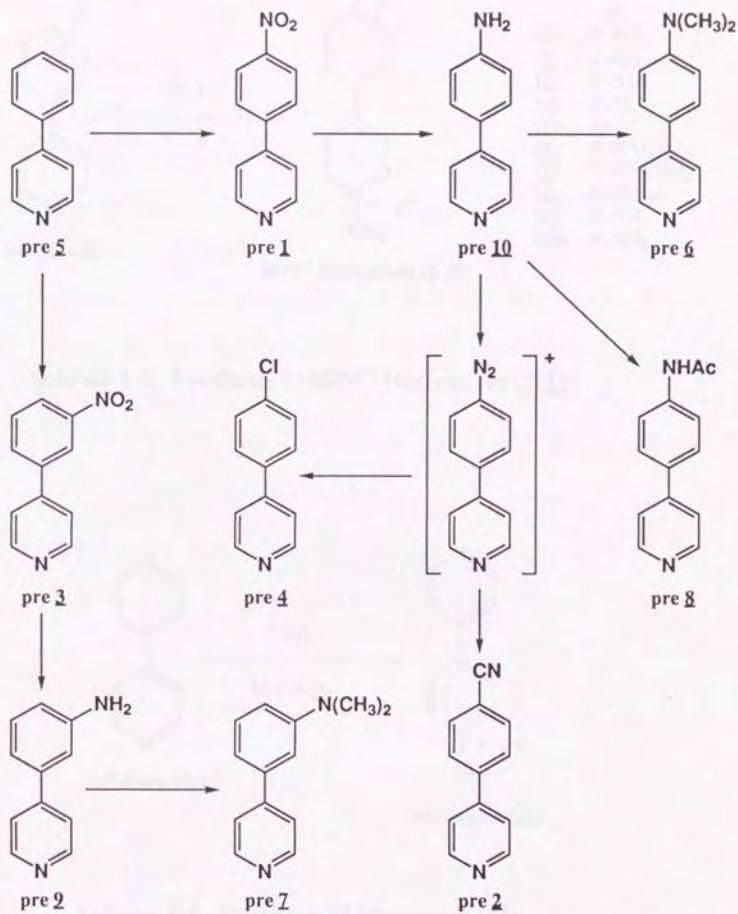
MPTP; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,

MPDP; 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridine,

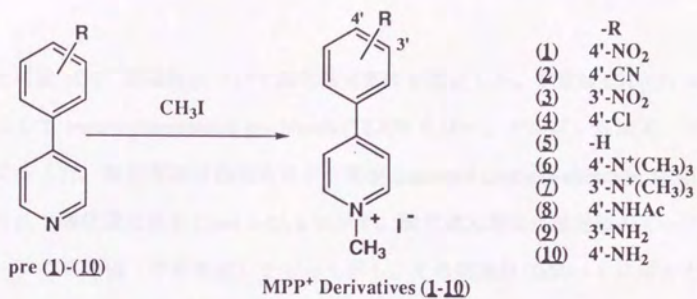
MPP⁺; 1-methyl-4-phenylpyridinium.

第1節 MPP⁺ 誘導体の合成

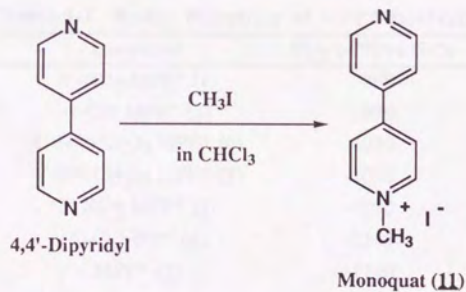
バラコートとの構造類似性を保つため、MPP⁺ のベンゼン環に置換基を導入した化合物の合成を目指した。MPP⁺ 誘導体の合成は、4-phenylpyridine を母化合物として Scheme 1-2 に従い 4-phenylpyridine 誘導体を合成した後、CH₃I で 4 級化することにより行った (Scheme 1-3)。すべての化合物は再結晶法により精製し、各種機器データにより構造を確認した。また monoquat (1-methyl-4-(4'-pyridyl)pyridinium) の合成に関しては、従来は精製したバラコートとの混合物より分離精製されていた⁷¹⁾ が、4,4'-dipyridyl の 200 mM 程度の CHCl₃ 溶液中、5 当量の CH₃I と室温下攪拌するだけで、収率良く、monoquat のみを選択的に得られるという、簡便で大量合成可能な合成方法を見いだした (Scheme 1-4)。



Scheme 1-2. Synthesis of 4-Phenylpyridine Derivatives



Scheme 1-3. Synthesis of MPP⁺ Derivatives (1-10)



Scheme 1-4. Synthesis of Monoquat (11)

第2節 MPP⁺ 誘導体の酸化還元電位

合成した各種 MPP⁺ 誘導体について酸化還元電位を測定した。測定は CH₃CN 中、支持電解質として tetraethylammonium perchlorate (TEAP) を用い、アルゴン気流下、プラチナ電極にて行った。参照電極は飽和カロメロ電極 (saturated calomero electrode; SCE) を用いた。得られた酸化還元波を Chart 1-2a, b に示す。酸化還元電位は還元波のピークと酸化波のピークの平均値 (半波電位) をもって示し、その結果は Table 1-1 に示すとおりである。MPP⁺ 誘導体の酸化還元電位は置換基の性質を良く反映していた。すなわち、電子吸引性の置換基を導入すると酸化還元電位はプラス側へ移動し、還元され易くなった。逆に電子供与性の置換基を導入すると酸化還元電位はマイナス側へ移動し、還元されにくくなった。酸化還元電位の最も高い化合物 1 (-860 mV) と最も低い化合物 10 (-1335 mV) との間には約 500 mV の開きがあった。

Table 1-1 Redox Potentials of MPP⁺ Derivatives

compound	E _{1/2} (mV) vs. SCE
4'-NO ₂ MPP ⁺ (1)	-860
4'-CN MPP ⁺ (2)	-990
4'-N ⁺ (CH ₃) ₃ MPP ⁺ (6)	-1050
3'-N ⁺ (CH ₃) ₃ MPP ⁺ (7)	-1050
3'-NO ₂ MPP ⁺ (3)	-1090
4'-Cl MPP ⁺ (4)	-1145
MPP ⁺ (5)	-1190
4'-NHCOCH ₃ MPP ⁺ (8)	-1220
3'-NH ₂ MPP ⁺ (9)	-1250
4'-NH ₂ MPP ⁺ (10)	-1335
monoquat (11)	-985
paraquat	-455

The redox potentials were measured in CH₃CN at 1 mM under argon atmosphere at room temperature with Pt electrode. The half wave potentials (E_{1/2}) versus a saturated calomel electrode (SCE) were determined by cyclic voltammetry.

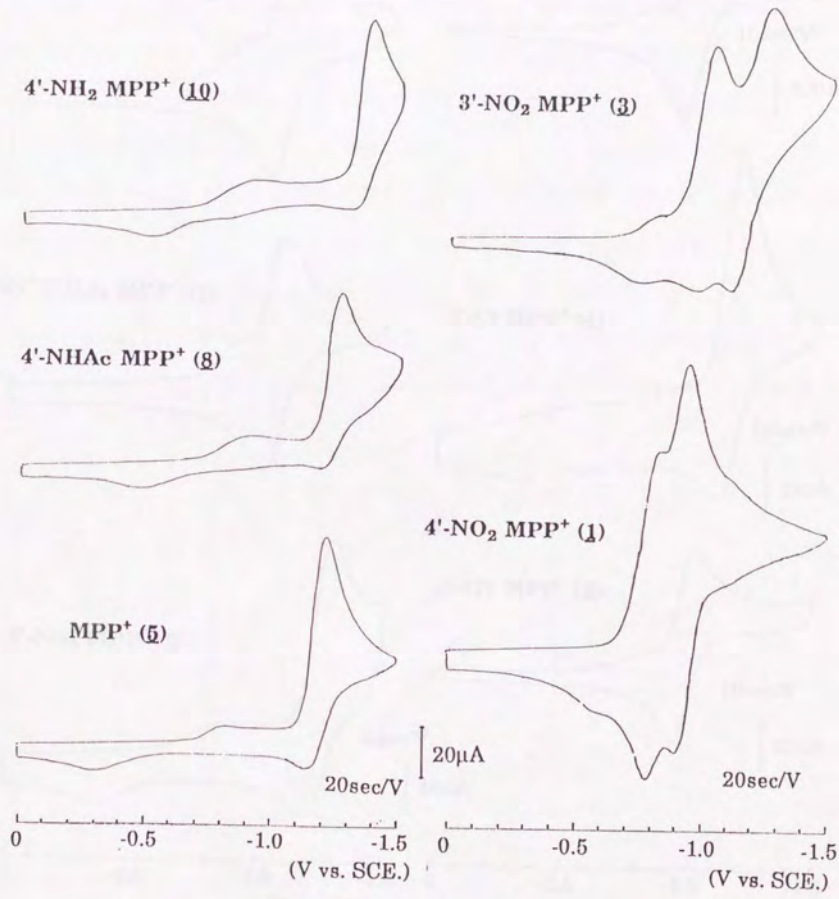


Chart 1-2a. Potential Curves of MPP⁺ Derivatives

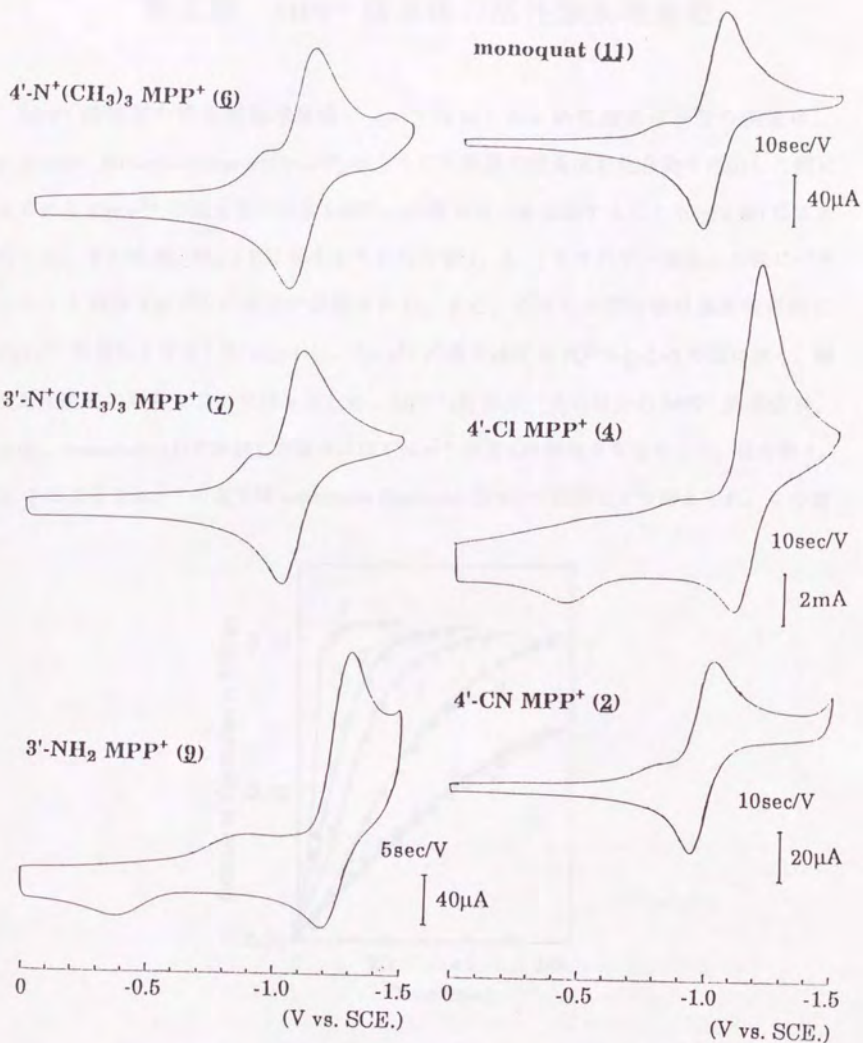


Chart 1-2b. Potential Curves of MPP⁺ Derivatives

第3節 MPP⁺ 誘導体の活性酸素増産能

MPP⁺ 誘導体の活性酸素増産能について検討した。活性酸素増産能の測定は、D-glucose、ferricytochrome c (Cyt.c³⁺) の入った大腸菌の懸濁液に化合物を添加した際に見られる Cyt.c³⁺ の還元量の増加を550 nmの吸収変化を追跡すること (Cyt.c法) により行った。その結果、Fig.1-1 に示すように化合物 1、2、3 をそれぞれ添加した際にパラコートと同様 Cyt.c³⁺ の還元が促進された。また、これらの化合物は濃度依存的に Cyt.c³⁺ の還元を促進した (Fig.1-2)。Cyt.c³⁺ の還元速度は PQ²⁺ > 1 > 2 > 3 の順に速く、酸化還元電位の順番と良い相関を示した。MPP⁺ (5) 自身、そのほかの MPP⁺ 誘導体 (4、6-10)、monoquat (11) を添加した場合には Cyt.c³⁺ の還元は促進されなかった。化合物 1、2、3 による Cyt.c³⁺ の還元は superoxide dismutase (SOD) の添加により抑えられ、この選

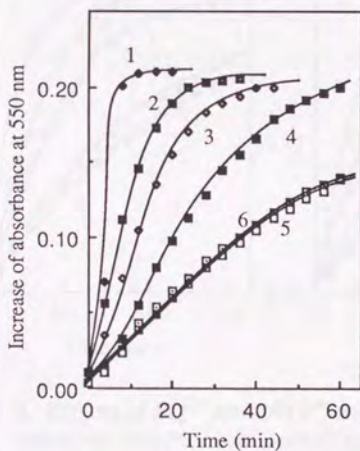


Figure 1-1. Cyt. c reduction mediated by PQ²⁺, MPP⁺ and MPP⁺ derivatives at 100 μ M under aerobic conditions. Line 1, PQ²⁺; line 2, compound 1; line 3, compound 2; line 4, compound 3; line 5, MPP⁺ (5); line 6, none.

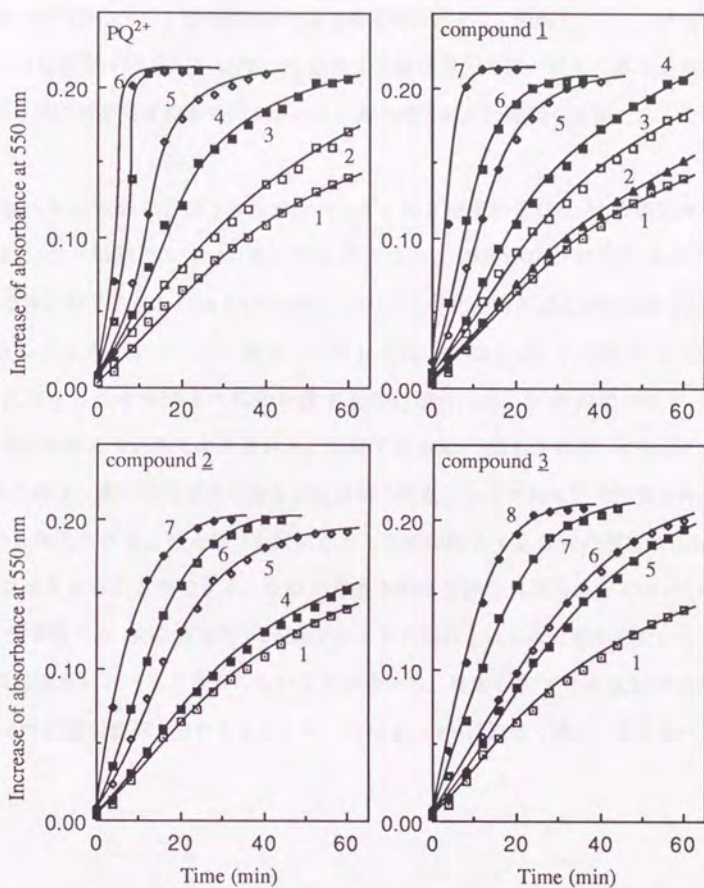


Figure 1-2. Effects of PQ²⁺ and MPP⁺ derivatives (1, 2, 3) on cyt. c reduction under aerobic conditions.

The reaction mixture contained PQ²⁺ and MPP⁺ derivatives (1, 2, 3) at the following concentrations; line 1, none; line 2, 1 μM; line 3, 5 μM; line 4, 10 μM; line 5, 50 μM; line 6, 100 μM; line 7, 500 μM; line 8, 1 mM.

元がいずれも $O_2^{\cdot-}$ によるものであることが確認された (Fig. 1-3)。以上の結果から、合成した MPP^+ 誘導体のうち 3 種の化合物が活性酸素増産剤として機能しうることが分かった。これらの化合物はいずれも MPP^+ (5) 自身より酸化還元電位が高く、還元されやすい。すなわち活性酸素増産能を発揮するために酸化還元電位は重要な要因であることが示された。

また、Fig. 1-3 で SOD の存在下にもかかわらず、約 8 分後から $Cyt.c^{3+}$ の還元が促進された。アルゴン気流下で $Cyt.c$ 法を行ったところ、酸素がないにもかかわらず $Cyt.c^{3+}$ の還元は促進された (data not shown)。このことは化合物の還元体が直接 $Cyt.c^{3+}$ を還元できることを示している。酸素が十分に存在する場合は、化合物の還元体が $Cyt.c^{3+}$ を還元するよりも酸素へ電子を渡す速度が速いため、SOD の添加によって $Cyt.c^{3+}$ の還元は抑えられると考えられる。空気下で SOD で阻害されない $Cyt.c^{3+}$ の還元が見られたのは、系中に存在する酸素が大腸菌の呼吸によって約 8 分で消費されてしまったためと考えられる。化合物 1 を例にとるとこの実験系で見られた現象は Scheme 1-5 のようにまとめることができる。SOD の存在下約 8 分後から見られた $Cyt.c^{3+}$ の還元速度は、化合物のみ (SOD 非存在下) を加えたときの速度とほとんど変わらないため、 k_2 、 k_3 の反応速度はほとんど変わらないことが分かる。酸素存在下では SOD の添加によって $Cyt.c^{3+}$ の還元が抑えられることから、 k_1 は k_2 、 k_3 に比べて速いと考えられる。

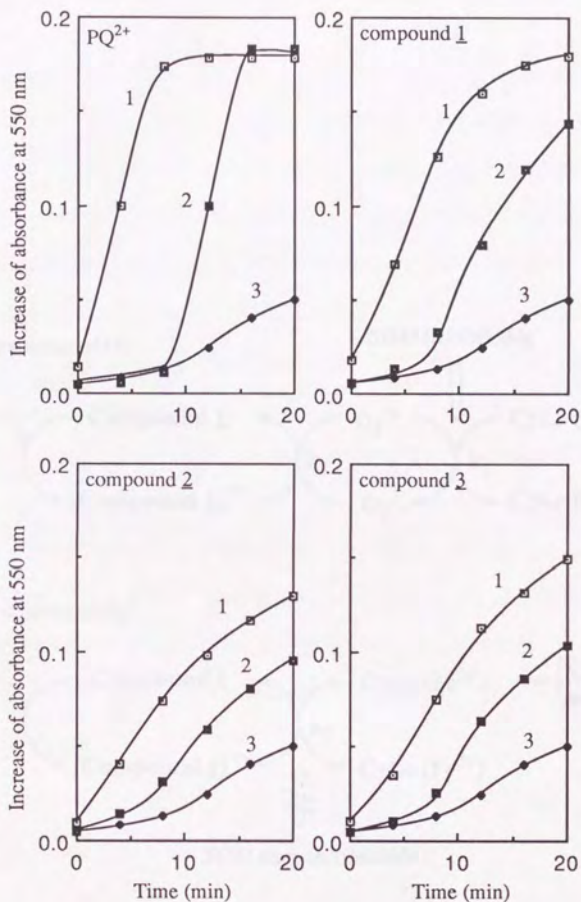
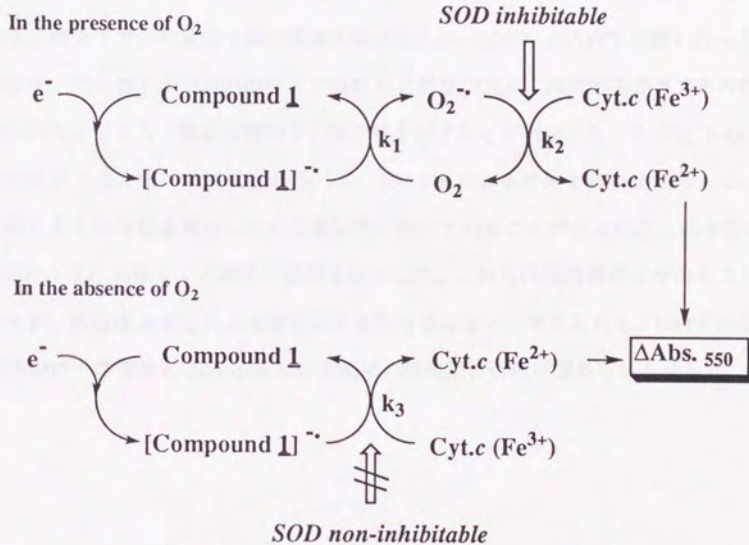


Figure 1-3. SOD effects on cyt. *c* reduction mediated by PQ^{2+} and MPP^+ derivatives (1, 2, 3) at $100 \mu M$. Line 1, in the absence of SOD; line 2, in the presence of SOD; line 3, in the presence of SOD but minus compound.



Scheme 1-5. Mechanism of Cyt. *c* Reduction

第4節 MPP⁺ 誘導体の大腸菌に対する増殖阻害活性

MPP⁺ 自身神経毒としての作用を持っているため⁶⁷⁻⁶⁹、合成した一連の化合物の生物活性には興味もたれる。また、その活性が酸素依存的なものであるかどうかを調べるため、好氣的及び嫌氣的条件下において大腸菌(B株、VB₁₂要求性)の増殖に対する影響を検討した。増殖阻害活性は、化合物の入ったGM培地中で大腸菌を生育し、その生育の度合いを620nmの濁度で測定した。GM培地とは、人工的に作られた主に無機塩からなる培地であり、炭素源として必要最小限のD-glucoseの入った栄養価の低い培地である。嫌気下での測定は十分に酸素を除いたグローブボックス内で同様に行った。

その結果、化合物1が好氣的条件下で増殖阻害活性が強く、嫌氣的条件下でその作用が軽減されることから、酸素依存的な生物活性を示すことが明かとなった(Fig. 1-4)。また、その作用は濃度依存的であり(Fig. 1-5)、Cyt.c法による結果と合わせて考えて、この化合物による活性酸素種の産生が生物活性に効いていることが示された。化合物2、4は酸素の存在に関係なく大腸菌の増殖を阻害した。これらの作用機序は今のところ不明であるが、活性酸素産生による障害は主な作用ではないと考えられる。MPP⁺ 自身を含め他のMPP⁺ 誘導体とmonoquatには大腸菌の増殖阻害活性は認められなかった。

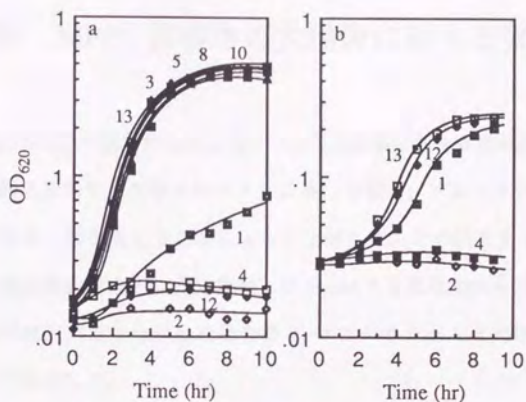


Figure 1-4. *E. coli* growth under aerobic conditions (a) and under anaerobic conditions (b).

E. coli was grown in GM medium containing PQ^{2+} [(a) at 10 μM or (b) at 100 μM] and MPP^+ derivatives [(a) and (b) at 1 mM]. Line numbers correspond to the number of compounds; line 12, PQ^{2+} ; line 13, none.

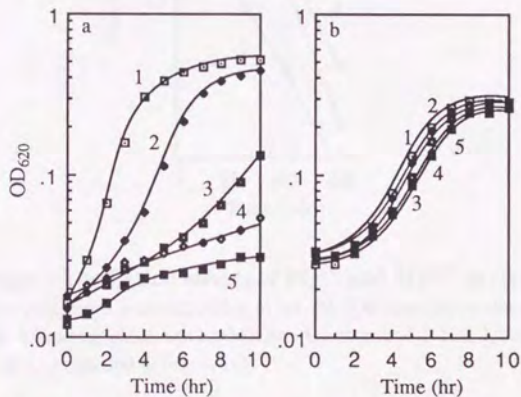


Figure 1-5. Effects of compound 1 on *E. coli* growth under aerobic (a) and anaerobic (b) conditions.

E. coli was grown in GM medium containing compound 1 at the following concentrations; Line 1, none; line 2, 0.25 mM; line 3, 0.5 mM; line 4, 0.75 mM; line 5, 1 mM.

第5節 MPP⁺ 誘導体の大腸菌に対する致死活性

さらに、増殖阻害活性の見られた化合物について大腸菌に対する致死活性を検討した。致死活性は各時間大腸菌を化合物と接触させた後、希釈し、プレートにまき、一晚インキュベートしコロニー数を数えることによって比較した。その結果を Fig. 1-6 に示す。酸素依存的な増殖阻害活性を示した化合物 1 は 1 mM でも致死活性を示さなかったが、酸素非依存的な増殖阻害活性を示した化合物 2、4 はバラコートと同等あるいはそれよりも強い致死活性を示した。

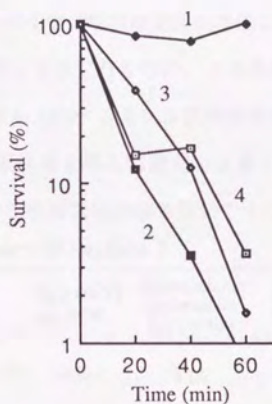


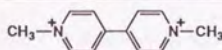
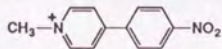
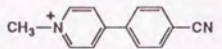
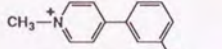
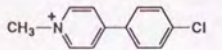
Figure 1-6. Lethal effects of PQ²⁺ and MPP⁺ derivatives.

The conditions were according to ref. 89. The reaction media contained the following additives (1 mM): line 1, compound 1; line 2, compound 2; line 3, compound 4; line 4, PQ²⁺.

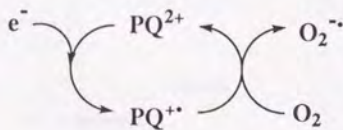
第6節 結論と考察

第1章で検討した結果を Chart 1-3 にまとめた。合成した MPP⁺ 誘導体のうち、化合物 1 は活性酸素増産能を示しかつ大腸菌に対し酸素依存的な増殖阻害活性を示した。その結果、この化合物はバラコートと同様、生物活性を持つ活性酸素増産剤として機能することが分かった。すなわち、酸化還元サイクルによって活性酸素種を発現していると考えられる。しかし、バラコートほど強力な致死活性は持っていなかった。化合物 2 および 4 は致死活性を含めて強力な生物活性を示した。化合物 2 は活性酸素増産能を示し、化合物 4 は活性酸素増産能を示さなかったが、両者は嫌氣的条件下でも大腸菌の増殖を阻害することから、これらの生物活性は酸素非依存的なものであるということが出来る。化合物 3 は活性酸素増産能こそ示したものの、その活性は弱く大腸菌に対し毒性を発揮するには至らなかった。結局 MPP⁺ 自身には活性酸素増産剤としての活性は認められなかったが、電子吸引性の置換基を導入し還元され易くなるように変化させることで、MPP⁺ 自身には見られない活性酸素増産能を見いだすことができた。

Chart 1-3. Summary of Section 1

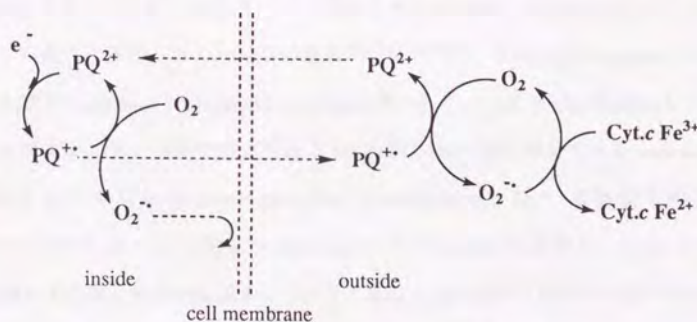
	$E_{1/2}$ (mV) vs. SCE	Extracellular Superoxide Formation	Growth Inhibition Aerobic/Anaerobic	Lethality
 Paraquat	-455	Yes	Yes / No	Yes
 4'-NO ₂ MPP ⁺ (1)	-860	Yes	Yes / No	No
 4'-CN MPP ⁺ (2)	-990	Yes	Yes / Yes	Yes
 3'-NO ₂ MPP ⁺ (3)	-1090	Yes	No / ---	---
 4'-Cl MPP ⁺ (4)	-1145	No	Yes / Yes	Yes

パラコートの構造を規範とした新たな活性酸素増産能の開発という意味では、MPP⁺という母化合物に電子吸引性の置換基であるニトロ基を導入することでその酸化還元電位をプラス側へ変化させ、生体内で還元され易くしたことが成功をもたらした原因であると考えられる。パラコートによる活性酸素増産機構としては先にも示した様に下記のようなメカニズムが支持されている (Scheme 1-6)。おそらくここで新たに提出された活性酸素増産剤、化合物 1 も同じような酸化還元サイクルによって活性酸素種を産生していると考えられる。パラコートにおいてはその 1 電子還元体が紫外可視吸収スペクトル 8,9) および ESR 法 72) により検出されており、酸素存在下ではこれらのスペクトルは速やかに消えてなくなることが分かっている。これらのことが酸化還元サイクルによる活性酸素種の産生を証拠付けている。そこで化合物 1 を用いて同様の検出を行ったところ、紫外可視吸収スペクトル、ESR 法いずれの方法によっても 1 電子還元体は確認できなかった。これはパラコートの 1 電子還元体であるパラコートカチオンラジカルが安定なのに比べて、化合物 1 の 1 電子還元体が安定に存在しないためと考えられる。また、化合物 1 の入った培地は無色であるが大腸菌の生育に伴って培地の色が黄色く変色した。その紫外可視吸収スペクトルの極大波長は化合物 1 (4'-NO₂ MPP⁺) と化合物 10 (4'-NH₂ MPP⁺) のスペクトルを合わせたものであり、おそらく大腸菌によって還元的代謝を受けたものと考えられる。また、化合物 1 を dithionite (Na₂S₂O₄) で還元すると、化合物 10 のスペクトルを与えることから、この化合物のニトロ基は還元され易いことが分かった。いずれにしても化合物 1 が大腸菌によって還元されうることは確かである。



Scheme 1-6. Redox Cycle of Paraquat

この実験の中で Cyt.c 法を用いた活性酸素増産能の測定を行っているが、この方法には議論すべき問題がある。それは、 $O_2^{\cdot -}$ 産生が細胞内でも起きているのかどうかということである。細胞内で産生された $O_2^{\cdot -}$ は、アニオン性のため、細胞膜を透過できない¹²⁾。また、添加した $Cyt.c^{3+}$ も細胞外に存在するため、測定された $O_2^{\cdot -}$ 量はすべて細胞外で産生されたものと考えられる (Scheme 1-7)。化合物の添加によって $O_2^{\cdot -}$ が産生されていることは、定性的には疑問の余地はないが、細胞内でどれだけ産生されているかということに関しては、明言することはできない。 $Cyt.c^{3+}$ の還元が大量に促進されても、細胞内では極く少量しか $O_2^{\cdot -}$ が産生されていないとすれば、内在性の SOD や catalase によって容易に分解されてしまい、細胞に対して毒性を発揮するには至らないだろう。実際、同様の実験系で行われたバラコートとベンゾフラザン類との比較において、活性酸素産生における質的な違いが議論されている²⁸⁾。すなわち、ベンゾフラザン類はバラコートに比べ 10 倍も Cyt.c 還元速度が速い。そしてバラコートと同程度の濃度で酸素依存的な増殖阻害活性を発揮する。ところが、ベンゾフラザン類は致死効果を全く示さない。従って、バラコートによる活性酸素種の生成は、質の高いものであると結論される。一連の MPP⁺ 誘導体のうち、3 種の誘導体に活性酸素産生能が見られたが、酸素依存的な増殖阻害活性を示したのは化合物 1 一つだけだった。比較的 $O_2^{\cdot -}$ 産生量

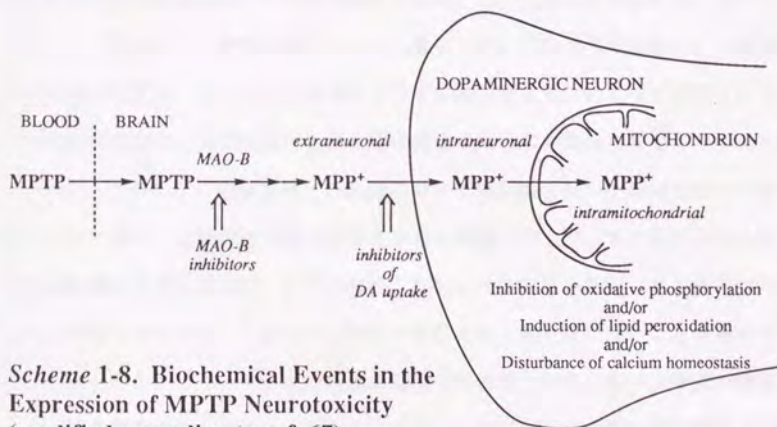


Scheme 1-7. Mechanism of Cyt.c Reduction Pathway
(modified according to ref. 12)

の少ない化合物 2、3 には酸素依存的な効果は見られなかった。また、化合物 1 は致死効果を発揮するに至らなかった。骨格的に非常に類似した化合物であるにも関わらず、バラコートに比べて弱い活性を示すことしかできなかった。このことからバラコートによる活性酸素種の産生は、質の高いものであることが分かる。細胞内で活性酸素種が産生されているかどうかを示すには、化合物添加後の内在性の SOD 活性あるいは catalase 活性の上昇を測定すれば、間接的ではあるが示すことができる。

ここでバラコートの酸素毒性に関する細胞内応答について最近の知見をまとめてみた。細胞内に取り込まれたバラコートは NADPH:PQ²⁺ diaphorase (73,74) によって 1 電子還元された後、酸化還元サイクルによって O₂^{·-} を生成する (10-12)。この O₂^{·-} は不均化により H₂O₂ になり、さらにこの H₂O₂ は鉄などの金属により反応性に富んだ活性酸素種である ·OH になる (4,75)。通常細胞内の O₂^{·-} 濃度は、10⁻¹⁰ M 程度と考えられている (76) が、バラコートやメナジオン等の活性酸素増産剤によって O₂^{·-} 濃度が高まると、細胞内は酸化的ストレスにさらされる。いくつかの酵素は O₂^{·-} に感受性が高く、速やかに失活する (77,78)。これらは活性中心に鉄硫黄クラスターを内包しており、このクラスターの分解が失活の原因と考えられている。また以前より酸化的ストレスにさらされると大腸菌は Mn SOD と Hy SOD そして catalase を誘導することが知られていた (10),19)。最近 O₂^{·-}、H₂O₂ によって誘導されるタンパク質はそれぞれ *oxyR*、*soxRS regulon* によって制御されていることが明らかになりつつある (3),74),79-81)。この *oxyR regulon* によって誘導される酵素は catalase や alkylhydroperoxidase 等であり、一方 *soxRS regulon* によって制御される現象は、O₂^{·-} 不均化酵素である Mn SOD、DNA 修復酵素である endonuclease IV、NADPH 産生を司る glucose-6-phosphate dehydrogenase、O₂^{·-} に感受性の高い fumarase A、B の代替として安定な fumarase C などの酵素の誘導や、*micF* という antisense RNA を発現し外膜の輸送タンパク質である OmpF 産生を低下させることなどが知られている。これらの *regulon* で支配されているタンパク質の変動は、酸化的ストレスに対応する合目的性が見られる。これらの防御効果が及ばないほど酸化的ストレスが過剰になると、DNA の切断などが致命的となり致死に至るものと考えられる。

MPP⁺ という化合物を扱っている以上、MPTP 発症パーキンソンニズムとの関わりを忘れることはできないが、本研究から得られた知見のみではパーキンソンニズム研究へ踏み込むことは難しい。パーキンソンニズム研究における作用機構の定説は次の様に考えられている (67)。体内に取り込まれた MPTP は、まずその脂溶性の高さのため血液脳関門 (BBB) を透過し、monoamine oxidase B (MAO-B) による酸化をへて MPP⁺ にまで代謝される。さらに MPP⁺ はドパミン性の神経細胞に選択的に取り込まれて濃縮され、そのミトコンドリアの呼吸鎖を阻害する (Scheme1-8)。このような機構が支持されているが、MPP⁺ の作用発現に活性酸素種の関わりを示す興味深い知見もいくつかある。例えば水上らは、ミトコンドリアを用いた実験で MPP⁺ の添加により NADH 依存的に O₂^{·-} が産生されることを示した (82)。また、Sinha らは、NADPH と NADPH-P₄₅₀ 還元酵素の存在下、MPP⁺ によって O₂^{·-} 産生が促進されることを見いだした (83)。第 2 章で述べる Chevion らの実験も MPP⁺ による大腸菌に対する障害が活性酸素種によることを示している (84,85)。しかしいずれも MPP[·] の検出はできておらず、酸化還元サイクルによって活性酸素種が発現されると結論することはできていない (86)。パーキンソン病研究からは、障害を受けた組織に特異的に SOD 活性の上昇が認められた例 (87) があり、活性酸



Scheme 1-8. Biochemical Events in the Expression of MPTP Neurotoxicity (modified according to ref. 67)

素とパーキンソン病あるいはパーキンソニズムとの関連は常に念頭におかれる問題として注目されている。酸化ストレスが結果として起きていることは明らかであるが、活性酸素種が原因でパーキンソン病あるいはパーキンソニズムが起きるかどうかはまだ疑問である。しかしもしMPP⁺による神経細胞障害が活性酸素種の産生によるものであるならば、ここで得られた新たな活性酸素増産剤 4'-NO₂ MPP⁺ は MPP⁺ 自身よりも強力な神経細胞障害を引き起こすことができるであろう。しかし MPTP による細胞障害機構は多段階ステップより成り立っているので、MPTP タイプの化合物としての活性に関してはこのかぎりではない。化合物 2 や 4 など酸素非依存的な生物活性を示す化合物もあるので、脳ミトコンドリアの呼吸鎖阻害活性など MPP⁺ 自身が活性を示す系においてこれらの活性について検討してみるとパーキンソニズム研究とのつながりがでてくるものと思う。ここで合成した MPP⁺ 誘導体の呼吸鎖阻害活性については、第2章で述べる。

最後に、今までに当教室で行われた活性酸素増産作用を示す化合物、ベンゾフラザン類 (26-28) やヘテロペントレン類 (24,25) との比較から、酸素依存的な増殖阻害活性と酸化還元電位との間により相関が見られたので、Chart 1-4 にそれを示す。この chart において、-900 mV 前後で境界線を引くことができる。すなわち、境界線を境にプラス側が酸素依存的な増殖阻害活性を示す化合物群である。ここに示した化合物は、骨格が異なるだけでなく脂溶性、水溶性の点についても異なるが、これらの化合物による酸素依存的な増殖阻害活性は、そのような性質によらずに酸化還元電位によって規定されているというのが興味深い。活性酸素産生能と酸化還元電位との相関は今までも示唆されていた (28) が、このように生物活性との相関において境界線を引いたのは初めてであり画期的なことである。今後新たな活性酸素増産剤を開発する上で、また新たな化合物の活性酸素増産能を予測する上で、1つの指標になることは間違いない。この境界線の示す具体的な意味については、1つには生体内で還元されうる上限に近いことは確かであるが、それ以上のことについてはまだ明確な意味づけはなされていない。今後の課題である。活性酸素増産作用を示すことで知られるキノン類については酸化還元電位と核酸の切断活性の間により相関があることが報告されている (29)。今回の結果と合わせて、化

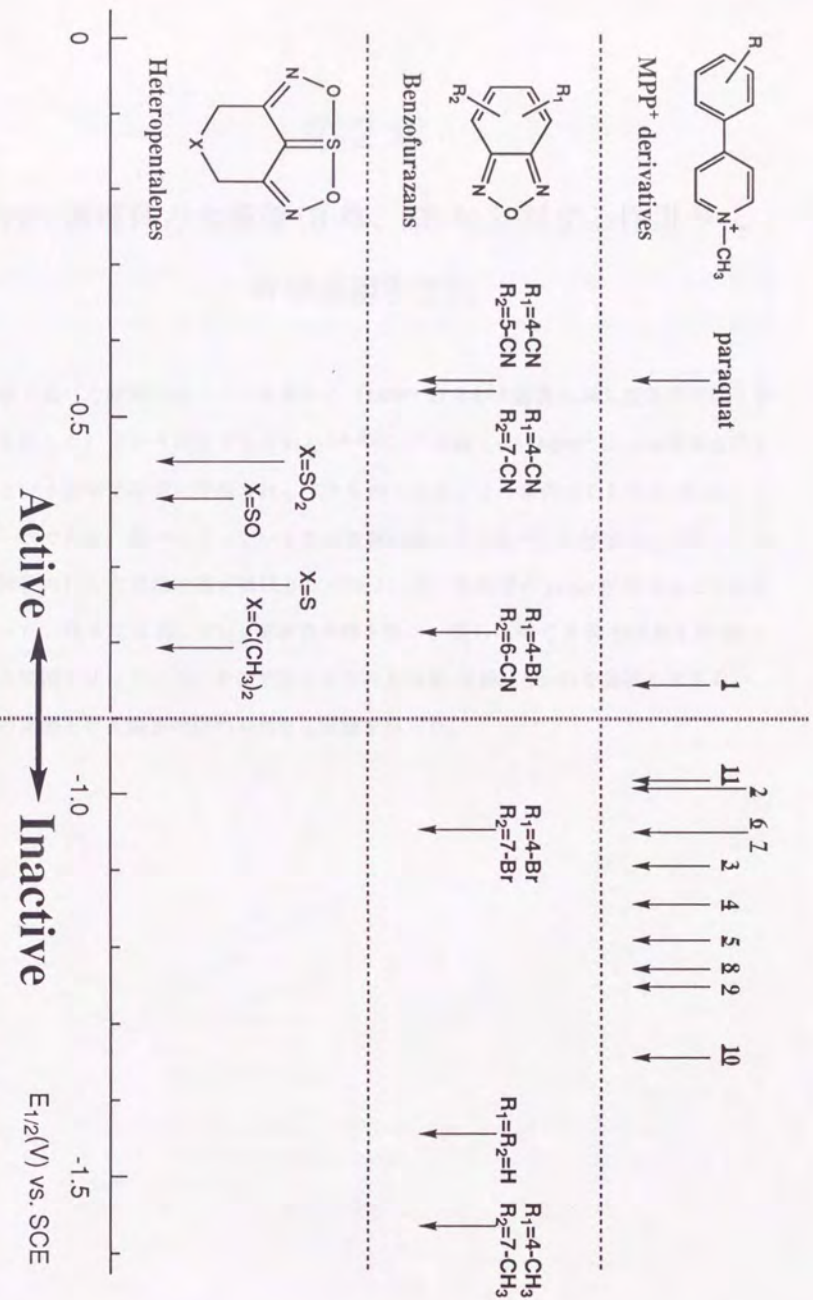


Chart 1-4. Correlation between O₂-dependent Toxicity and Redox Potential

第2章

MPP+ 誘導体の大腸菌 (B 株、SR-9) に対する作用⁸⁸⁾と

呼吸鎖阻害活性

第1章で述べた研究を行っている中に「MPP+ 自身が大腸菌に対し酸素依存的な致死活性を示した」という報告がなされた⁸⁴⁻⁸⁵⁾。この論文は、MPP+ による酸素毒性を示したという意味で非常に評価されるべきものである。この報告をしたのは Chevion らのグループである。我々の行っている致死実験は彼らの方法⁸⁹⁾を参考にして行っているため両者の行った実験の違いはほとんどなく、唯一大腸菌の strain が異なっているだけであった。我々は B 株、VB₁₂ 要求性の株を用い、彼らは同じ B 株ではあるが SR-9 という大腸菌を使っていた。そこで彼らにこの大腸菌 (B 株、SR-9) を提供してもらい、第1章の実験とは大腸菌の株のみ異なる実験を行った。

第1節 MPP⁺ 誘導体の活性酸素増産能

第1章と同様、Cyt.c法を用いて行った。その結果、若干異なる結果を得た。すなわち Cyt.c³⁺ の還元は化合物 1、2、3、4 によって促進された (Fig. 2-1a)。また、SOD の添加によって還元が阻害されたのは、化合物 1、3、4 の場合であった (Fig. 2-1b)。化合物 2 の場合のみ SOD で極くわずかしか阻害されなかったのは、化合物 2 による直接的な Cyt.c³⁺ の還元が速く、SOD の unit 数の少ない場合には阻害されなかったものと考えられる。いずれにしてもこれらの化合物は、MPP⁺ 自身より酸化還元電位がプラス側にあり、MPP⁺ よりも還元され易い。ここでも活性酸素増産能と酸化還元電位により相関が見られた。

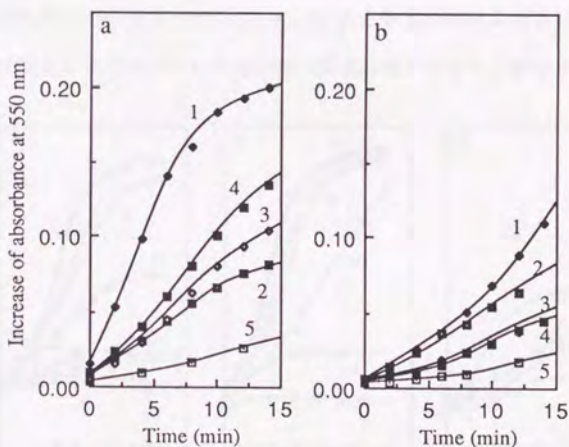


Figure 2-1. Cyt. c reduction mediated by MPP⁺ derivatives at 500 μ M in the absence (a) or presence (b) of SOD under aerobic conditions.

Line 1, compound 1; line 2, compound 2; line 3, compound 3;
line 4, compound 4; line 5, none.

第2節 MPP⁺ 誘導体の大腸菌に対する増殖阻害活性

第1章とほとんど同じ条件で行った。好氣的条件下、大腸菌(B株, SR-9)を化合物の入った培地中で生育したところ、アセトアミド基を除く置換基を4'-位にもつMPP⁺誘導体(1、2、4、6、10)に選択的に増殖阻害活性が見られた(Fig. 2-2a)。さらに、この活性が酸素依存的なものであるかどうかを調べるため、嫌氣的条件下で同様に行ったところ、化合物を含まない培地中でも大腸菌が育たず、GM培地を用いた条件で比較することはできなかった。そこでGM培地にYeast Extractを含む、より栄養に富んだ培地(YE培地)中で生育したところ、嫌氣的条件下でもかろうじて増殖が見られた。YE培地を用いて得られた結果をFig. 2-2b、Fig. 2-2cに示す。好氣的条件下ではGM培地中と同様、アセトアミド基を除く置換基を4'-位にもつMPP⁺誘導体選択的に増殖阻害効果が見られた。また、嫌氣的条件下でも化合物2、4、10は大腸菌の増殖を阻害した。これらの増殖阻害活性は酸素に依存せずむしろ化合物の構造に依存することが示された。

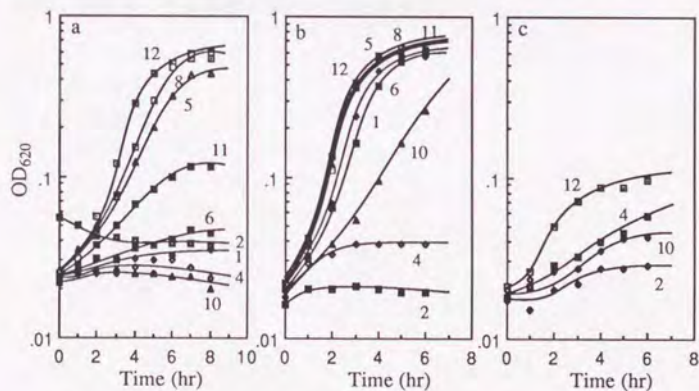


Figure 2-2. *E. coli* growth under aerobic conditions (a, b) and anaerobic conditions (c).

E. coli was grown in GM medium (a) and YE medium (b, c) containing MPP⁺ derivatives and monoquat at 1 mM. Line numbers correspond to the number of compounds; line 12, none.

第3節 MPP⁺ 誘導体の呼吸鎖阻害活性

パーキンソニズム研究から MPP⁺ の神経細胞における呼吸鎖阻害活性が示されていること 67-69) は上述した。そこで大腸菌においても呼吸鎖阻害活性が見られないかと考えた。上記第2節で見られた置換位置選択的生物活性との相関を考慮し、大腸菌 (B 株、SR-9) のフレンチプレス膜を調製し、呼吸鎖阻害活性について検討した。フレンチプレス膜とは大腸菌の呼吸鎖タンパク質を含む膜画分であり、通常細胞を構成している際にはおもてと裏が逆になっている、別名 inside-out membrane と呼ばれるものである。フレンチプレス膜は常法 90) に従い調製した。Lowry 法 91) によるタンパク定量の結果、46.9 mg protein/ml の値を得た。呼吸鎖阻害活性は、呼吸基質である NADH の消費による 340 nm の吸収の減少と、クラーク型酸素電極による酸素消費の 2 通りで測定した。その結果を Table 2-1、2-2 に示す。いずれの測定法においても、大腸菌に対する呼吸鎖阻害剤 92) として知られる KCN や 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HQNO) は阻害を示したが、MPP⁺ 誘導体による阻害は認められなかった。

Table 2-1 Inhibitory Effect on NADH Oxidation by FPM

compound (100 μ M)	NADH oxidation	
	Initial rate constant ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)	Inhibition (%)
control ¹⁾	17.7	0
4'-NO ₂ MPP ⁺ (1)	17.2	2.8
4'-CN MPP ⁺ (2)	16.7	5.6
3'-NO ₂ MPP ⁺ (3)	17.5	1.1
4'-Cl MPP ⁺ (4)	15.8	10.7
MPP ⁺ (5)	16.9	4.5
MPP ⁺ (5; 500 μ M)	16.9	4.5
4'-N ⁺ (CH ₃) ₃ MPP ⁺ (6)	18.4	-4.0
3'-N ⁺ (CH ₃) ₃ MPP ⁺ (7)	16.3	7.9
4'-NHCOCH ₃ MPP ⁺ (8)	n.d.	---
3'-NH ₂ MPP ⁺ (9)	16.9	4.5
4'-NH ₂ MPP ⁺ (10)	n.d.	---
monoquat (11)	17.5	1.1
control ²⁾	8.22	0
EtOH (30 μ l)	8.07	1.8
KCN (2 mM)	1.26	85
HQNO (40 μ M)	3.12	62

NADH oxidation was monitored at 340 nm in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) at 37 °C. HQNO was dissolved in EtOH at 4 mM and added.

1) 100 μ M NADH, 93.8 μ g protein/ml FPM.

2) 100 μ M NADH, 46.9 μ g protein/ml FPM.

n.d.; not determined.

FPM; French Press Membranes.

HQNO; 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide.

Table 2-2 Inhibitory Effect on O₂ Consumption by FPM

compound (1 mM)	O ₂ consumption	
	Initial rate constant (min ⁻¹)	Inhibition (%)
control	26.3	0
4'-NO ₂ MPP ⁺ (1)	26.5	-0.76
4'-CN MPP ⁺ (2)	24.0	8.7
3'-NO ₂ MPP ⁺ (3)	24.8	5.7
4'-Cl MPP ⁺ (4)	25.0	4.9
MPP ⁺ (5)	26.8	-1.9
4'-N ⁺ (CH ₃) ₃ MPP ⁺ (6)	25.8	1.9
3'-N ⁺ (CH ₃) ₃ MPP ⁺ (7)	26.7	-1.5
4'-NHCOCH ₃ MPP ⁺ (8)	25.7	2.3
3'-NH ₂ MPP ⁺ (9)	25.5	3.0
4'-NH ₂ MPP ⁺ (10)	26.0	1.1
monoquat (11)	27.5	-4.6
HQNO (40 μM)	5.47	79
HQNO ¹⁾ (40 μM)	4.80	82
EtOH (20 μl)	27.0	-2.7
KCN ¹⁾ (5 mM)	0.50	98

O₂ consumption was measured by Clark-type O₂ electrode in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) at 37 °C, containing 0.75 mM NADH and 235 μg protein/ml FPM. HQNO was dissolved in EtOH at 4 mM and added. After preincubation of tested compounds with FPM in the reaction cell for 10 min at 37 °C, NADH was added and O₂ consumption was monitored.

1)The compounds were added after 50 % O₂ consumption without preincubation.

FPM; French Press Membranes.

HQNO; 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide.

また、九州大学医学部の竹重先生との共同研究において MPP⁺ 誘導体のミトコンドリア (bovine heart) に対する呼吸鎖阻害活性とそれに基づく O₂⁻ 産生能、及び PC12 に対する細胞毒性について検討した。その結果をここに列挙する。

1) NADH oxidase 阻害活性 (Fig. 2-3a-g)

NADH oxidase 阻害活性は、酸素消費速度によって測定した。その結果化合物 1 は 8 mM の濃度でも全く阻害しなかった。呼吸鎖阻害剤である rotenone の存在下、化合物 1 の濃度を上げていくと濃度依存的に酸素消費速度が上昇した。このことから化合物 1 を介して酸素への電子の漏れが予測された。化合物 8 と化合物 10 の阻害効果は弱く、8 mM でも阻害は 50% に達しなかった。化合物 6 と化合物 7 は同程度の阻害を示した。

2) Cytochrome b (Cyt.b) 還元に対する阻害活性 (Fig. 2-4a-c)

NADH oxidase 阻害活性の結果から、化合物 1 が事実電子伝達を阻害しないかどうか疑問がもたれた。そこで阻害活性を示さなかった化合物 1 と比較的強い阻害活性を示した化合物 7 を用いて、Cyt.b 還元に対する効果を検討した。Cyt.b 還元の変化は Q-band のスペクトル変化から追跡した。化合物 1 は 8 mM の濃度でほとんど阻害しなかった。しかしデータには示さないが、Cyt.b の還元を完全に阻害する濃度の rotenone を化合物 1 と共に加えたときに、Cyt.b は還元された。化合物 7 と化合物 5 (MPP⁺) は NADH oxidase 阻害と同様 Cyt.b の還元を阻害した。

3) CoQ 10 還元に対する阻害活性 (Fig. 2-5a-c)

化合物 1 による電子伝達阻害を確認するため、さらに CoQ 10 還元に対する阻害活性を検討した。CoQ 10 還元の測定は、HPLC にて行った。その結果、化合物 1 は化合物 7 と同程度の阻害をした。化合物 5 も同様に CoQ 10 還元を阻害した。

以上の結果から、化合物 1 は complex I から CoQ 10 への電子伝達を阻害すると同時に、complex I から自らは還元され、さらに還元型の化合物 1 が直接、あるいは O₂⁻ を介して Cyt.b を還元する可能性が考えられた。化合物 7 と化合物 5 は complex I から CoQ 10 への電子伝達を阻害することが分かった。

4) $O_2^{\cdot -}$ 生成活性 (Fig. 2-6a,b, Table 2-3)

ここで用いているミトコンドリア (bovine heart submitochondrial particles; SMP) は、NADH を基質として $O_2^{\cdot -}$ 生成し、生成部位の 1 つが complex I であることが知られている。rotenone や MPP⁺ は complex I から CoQ 10 への電子伝達を阻害し、complex I での $O_2^{\cdot -}$ 生成を促進する⁹³⁾。

adrenochrome 法により $O_2^{\cdot -}$ 生成活性を測定した。その結果、化合物 5 は濃度依存的に $O_2^{\cdot -}$ 生成を増加させ、20 mM で最大になった。その最大値は rotenone と同程度だった。化合物 1 も濃度依存的に $O_2^{\cdot -}$ 生成を促進し、1 mM で rotenone や化合物 5 の約 4.5 倍にもなり、rotenone の存在下でさらに増加した。

5) PC12 に対する細胞毒性 (Fig. 2-7a,b)

さらに PC12 に対する細胞毒性を検討したところ、化合物 7 は化合物 5 と同程度の毒性を示し、呼吸鎖阻害による ATP 産生の阻害が細胞毒性に影響をもたらすものと考えられた。化合物 1 は control と比較してわずかに増殖抑制効果が見られるだけだった。この理由として、化合物 1 は細胞内へ取り込まれるのかどうか、また complex I から CoQ 10 への電子伝達は阻害するが Cyt. b を還元するため、電子伝達系での 3ヶ所の ATP 産生部位のうち 2ヶ所での ATP 産生が可能のため ATP が枯渇しないのではないかと考えられる。

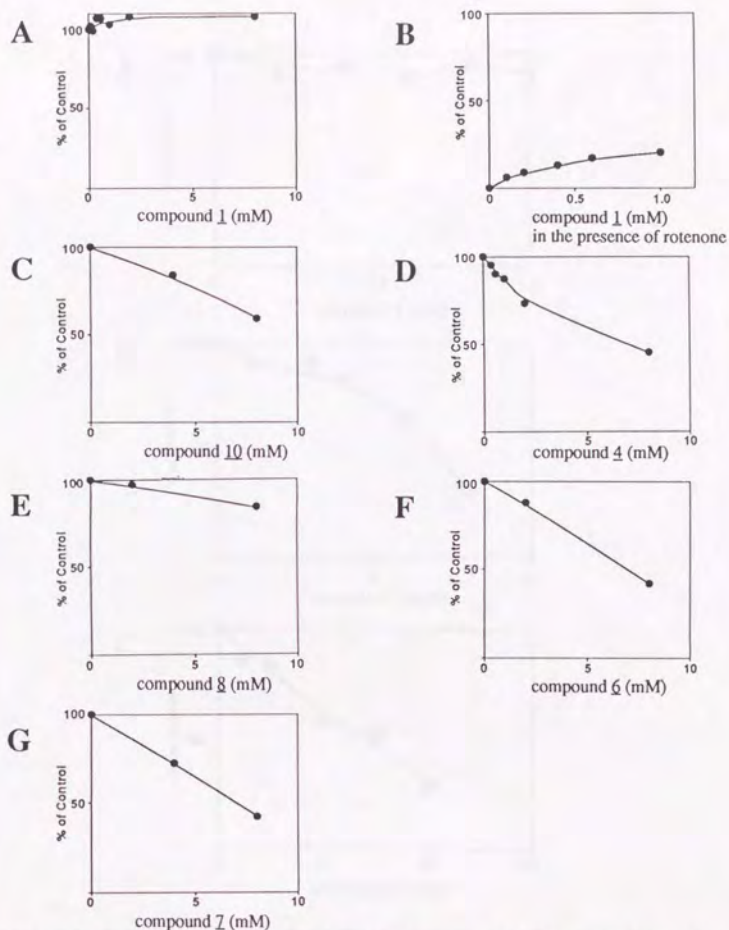


Figure 2-3. Inhibitory effect of MPP⁺ derivatives on NADH oxidase activity in submitochondrial particles (SMP).

NADH oxidase activity was measured polarographically in a Clark electrode at 37 °C. The SMP (0.1 mg/ml) were preincubated in a final volume of 1.6 ml of respiration medium containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) and 0.1 mM EDTA with or without MPP⁺ derivatives for 10 min. The reactions were initiated by the addition of 1.0 mM NADH. The rate of NADH oxidation in SMP was 592 nmol O₂/min/mg of protein. The data shown were the averages of two independent determinations.

A; compound 1, B; compound 1 in the presence of 5 μM of rotenone, C; compound 10, D; compound 4, E; compound 8, F; compound 6, G; compound 7.

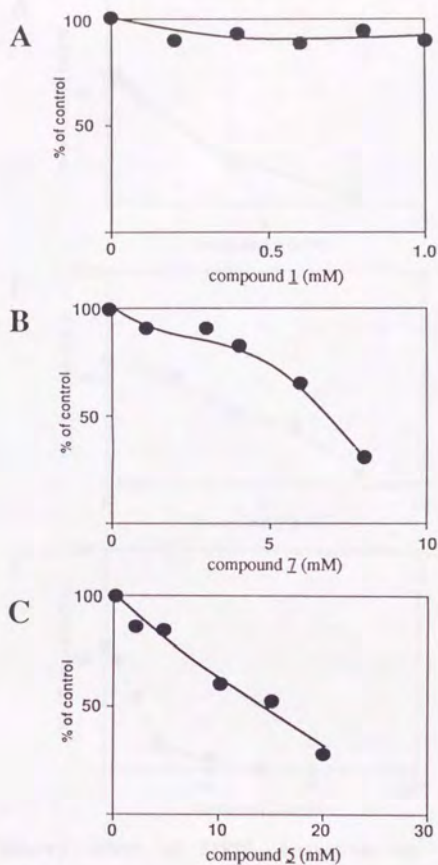


Figure 2-4. Inhibitory effect of MPP^+ derivatives on the reduction of cytochrome *b* (Cyt.*b*).

The SMP were preincubated in the reaction mixture containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA with or without MPP^+ derivatives for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of 0.2 mM NADH. After 2 min, the reduction of Cyt.*b* was monitored in a double-beam spectrophotometer determining $\epsilon_{562-575}$ ($\epsilon=17.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The rate of reduced Cyt.*b* was 0.37 nmol/0.5 mg of SMP. The values shown were the averages of two independent determinations.

A; compound 1, B; compound 2, C; compound 5 (MPP^+).

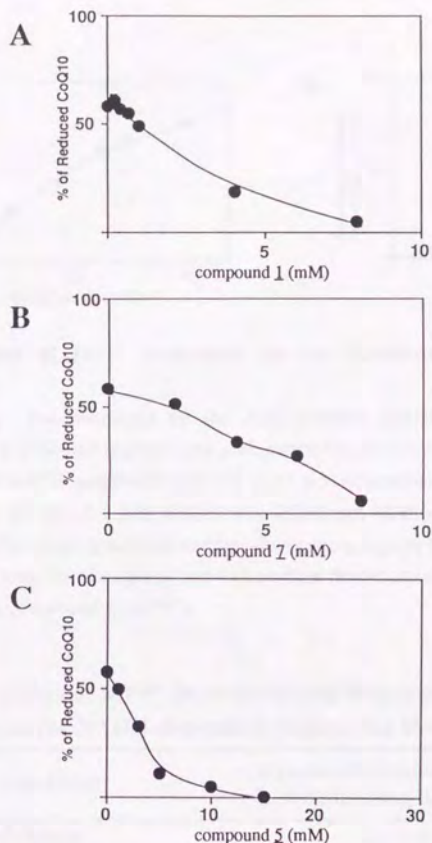


Figure 2-5. Inhibitory effect of MPP⁺ derivatives on the reduction of ubiquinon-10 (CoQ 10).

The redox-state of the CoQ 10 in SMP was determined by separating reduced and oxidized ubiquinones by HPLC. SMP were preincubated in the reaction mixture containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA with or without MPP⁺ derivatives for 10 min at 37 °C, and 0.1 mM NADH was added. After 2 min, CoQ 10 was extracted by adding 5 volumes of methanol/light petroleum (3:2; v/v) containing 1 mg/ml pyrogallol and petroleum layer was collected after centrifugation for 1 min. The petroleum layers were evaporated under N₂ stream. The residue was solubilized by the solvent of HPLC and injected in HPLC. The data shown were averages of two independent determinations. A; compound 1, B; compound 7, C; compound 5 (MPP⁺).

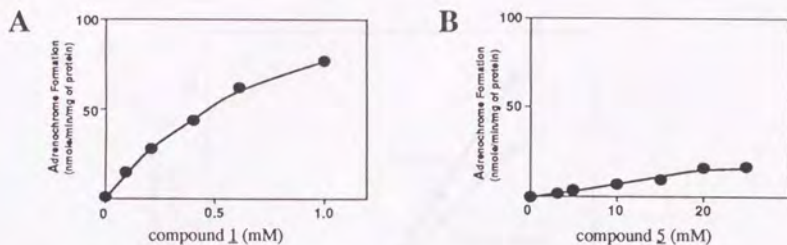


Figure 2-6. Effect of MPP⁺ derivatives on the NADH-dependent superoxide (O₂^{•-}) production.

Production of O₂^{•-} was measured by the SOD-sensitive oxidation of adrenaline to adrenochrome. The SMP (0.5 mg/ml) were preincubated in the reaction mixture containing 0.25 M sucrose, 50 mM HEPES/NaOH (pH 7.0) and 1 mM adrenaline with or without MPP⁺ derivatives. After 10 min, 0.1 mM NADH was added and adrenochrome formation was monitored in a double-beam spectrophotometer determining $\epsilon_{485.575}$ ($\epsilon=2.96 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

The values shown were the averages of two independent determinations.

A; compound 1, B; compound 2 (MPP⁺).

Table 2-3 Effect of MPP⁺ Derivatives and Respiratory Chain Inhibitors on the NADH-dependent Superoxide Production

condition	superoxide production (nmole/min/mg of protein)
no inhibitors	0.3 ± 0
rotenone (5 μM)	17.3 ± 0.7
compound 2 (MPP ⁺ ; 20 mM)	17.0 ± 0.3
compound 1 (1 mM)	76.6 ± 6.9
SMP (-)	0
NADH (-)	0
adrenaline (-)	0
+SOD (40 μg/ml)	0
+rotenone (4 μM)	97.3 ± 7.0

The assay conditions were as described in Fig. 2-6. The values were mean ± S.D. of four independent determinations.

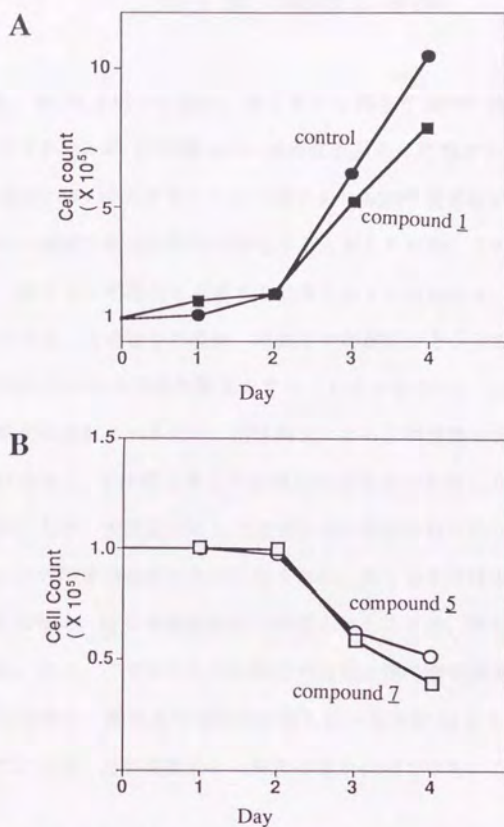


Figure 2-7. Cell viability of PC12 cells treated with MPP⁺ derivatives.

PC12 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum and 5% heat-inactivated horse serum at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂. For cytotoxicity experiments, cells were seeded in 24-well trays at 1x10⁵/well. Twelve to 24 hr later, medium was exchanged to 1 ml of the complete medium containing 1 mM of MPP⁺ derivatives. After the indicated period, the medium was aspirated from each well. Each well was then briefly rinsed with RPMI 1640 to wash dead cells and attached live cells were determined by the crystal violet stain method.

A; control and compound 1, B; compound 5 (MPP⁺) and compound 7.

第4節 結論と考察

大腸菌 (B株, SR-9) を用いた場合、第1章とは異なり MPP⁺ 誘導体の構造に依存した生物活性が示された。4'-位置換 MPP⁺ 誘導体選択的に活性があり、3'-位に置換基を持つ MPP⁺ 誘導体と 4'-位にアセトアミド基をもつ MPP⁺ 誘導体に活性が見られなかったことは、かなり厳密な構造依存性が存在すると考えられる。この原因は定かではないが、レセプター的なものの存在を示唆する結果であると思われる。第1章で得られた結果と比較してみると、化合物 1 の場合、嫌気下での測定が不十分であることからその活性の酸素依存性については明確な答えをすることはできない。しかし、Cyt.c法により活性酸素増産能が示されているため、活性酸素による生物活性も含まれていると言うことはできる。化合物 2、4 は第1章と同様強力な生物活性を示した。また両者とも活性酸素増産能を示したが、大腸菌に対しては明らかに酸素非依存的な増殖阻害活性を示した。化合物 3 は活性酸素増産能こそ示したものの、第1章と同様生物活性を示すには至らなかった。化合物 6、10 に増殖阻害活性が見られたことは、明らかに第1章とは異なる結果といえる。またここで示された生物活性は化合物の酸化還元電位と全く相関がなく、合成した化合物中、酸化還元電位的に最も低い化合物 10 にも酸素非依存的な生物活性が見られたことは、活性酸素による障害が主な作用ではないことの1つの証拠と考えられる。

活性酸素増産能という観点から述べると、-1145 mV (vs. SCE) という低い酸化還元電位を持つにも関わらず化合物 4 にも活性が示され、還元系 (大腸菌) 側の変化によって還元され得る化合物の酸化還元電位の限界も変化してくることが示された。このことは還元系が変化すれば、MPP⁺ 自身 (-1190 mV vs. SCE) も活性酸素増産能を示すことが可能になるかも知れないということを示唆している。

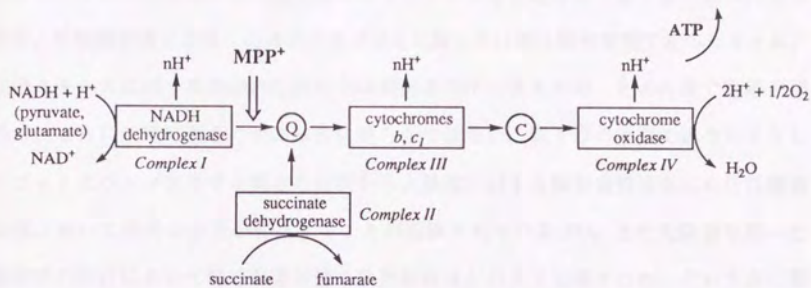
そこで問題になってくるのは、Chevionらが示した MPP⁺ 自身による酸素依存的な生物活性はなぜ起きたのかということである。彼らの行った実験の追試を行っていないの

で頭から否定することはできないが、致死実験を行った際、MPP⁺ 1 mM でもこの大腸菌 (B 株, SR-9) は 60 min で 50% 程度の生存率を示した。彼らの実験では 1 mM、15 min で 1% 程度と強力である。また、彼らの示したデータの中で酸素依存性を示すのは、嫌氣的条件下で MPP⁺ による致死活性が抑えられたことによるが、致死実験で嫌氣性を保つのは技術的に難しく、彼らが行ったように反応液に 20 min 間 N₂ gas を吹き込み、大腸菌と化合物を接触させるときに N₂ 気流下にただけで酸素依存的な生物活性が減少するというのは疑問である。大腸菌 (B 株, SR-9) を使った印象は、GM 培地中嫌氣的条件下では育たないこと、増殖阻害を示さない化合物でも致死実験では強力な活性を示してしまうことなどから、第 1 章で用いた大腸菌 (B 株, VB₁₂ 要求性) に比べて生命力が弱いのではないかと考えられる。この大腸菌 (B 株, SR-9) 株がどのような特質を持った株であるのか、今のところその情報が得られていないが、その点が明かとなりここで得られた活性との間に何らかのつながりがあれば興味深いと思う。

パーキンソニズム研究との関連を目指した呼吸鎖阻害活性の検討の結果、大腸菌に対する呼吸鎖阻害活性はないと言わざるを得ない。しかし、この結果は必ずしもパーキンソニズム研究と相矛盾するものではない。MPP⁺ が呼吸鎖を阻害するのは高等動物の神経細胞であり、そこでの呼吸鎖の構成成分は大腸菌に比べて格段に多く、効率の良い進化したものである。また、MPP⁺ による呼吸鎖阻害部位は、呼吸鎖阻害剤で知られる rotenone の阻害部位と同じ NADH-quinone 酸化還元酵素のキノン結合部位であるという報告がある (Scheme 2-1) 94,95)。そして rotenone は大腸菌の呼吸鎖に対して不活性であること 96) から、大腸菌の呼吸鎖に対し MPP⁺ 誘導体が不活性であることは十分考えられる。

実際、竹重先生との共同研究の結果、MPP⁺ 誘導体に動物のミトコンドリアに対する呼吸鎖阻害活性が見られた。活性の強さは MPP⁺ と大きな差はなく、阻害部位も上記と同じ部位と考えられる。化合物 1 は第 1 章、第 2 章で検討したのと同様活性酸素増産能が見られたが、PC12 細胞に対する効果は、酸素毒性よりも呼吸鎖阻害活性の影響が反映した結果となった。化合物 1 が NADH oxidase で還元された後、直接あるいは O₂^{·-} 生

成を介して Cyt. *b* を還元できるというのは非常に興味深い現象である。これらの結果は、MPP⁺ によるパーキンソンニズム活性が活性酸素の発現によるものではなく、呼吸鎖阻害による ATP の枯渇が原因であると結論づけるものである。



Scheme 2-1. Effect of MPP⁺ on the Respiratory Chain
(modified according to ref. 67)

Q: ubiquinone, C: cytochrome *c*

第3章

アルキル鎖長の異なるパラコート類縁化合物の酸素毒性

パラコートの活性発現に活性酸素種が関与していることは序章、第1章で述べたとおりだが、活性酸素種を産生した後のメカニズムに関しては第1章の考察で述べたように、酸化ストレスに対する細胞の応答などは検討されているものの、どの程度で増殖が阻害され、さらに致死に至るのかは未だに明らかではない。第1章の考察で述べたようにパラコートとベンゾフラザン類との比較から大腸菌に対する酸素毒性発現には活性酸素種発現において質的な差異が存在することが指摘されている(28)。また大腸菌を用いた生物活性の検討において増殖阻害活性と致死活性はどのように違うのか、という点に関してもまだ定説はなく、濁度の変化による違いを増殖阻害活性(bacteriostatic effect)、コロニー数の違いによる効果を致死活性(bacteriocidal effect)と言っているに過ぎない。

筆者が研究の過程で見出したモノコートの大量合成法は、一方がメチル基で他方のアルキル鎖長のことなるパラコートアナログ(C_1C_n)を簡便に合成することを可能にした(Chart 3-1)。そこでパラコートがもたらす細胞障害の機構を解明する目的で、アルキル鎖長が1から10までの C_1C_n 化合物を合成し、種々の検討を行った。これらの化合物はパラコートと比べてその酸化還元特性は変化せずに、化合物の脂溶性の変化が期待され、それに伴う細胞内への取り込みの違い及び細胞内挙動の違いが生物活性にどのように反映されてくるのかといった興味もたれた。

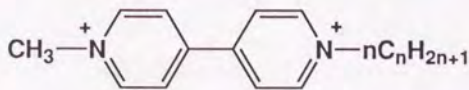


Chart 3-1. Structure of C_1C_n Compounds

第1節 C₁C_n 化合物の合成

大量のモノコートを作成した後、他方のピリジン環を $n\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{I}$ ($n=1-8$) で 4 級化した。モノコートのカウンターアニオンが iodide のためカウンターアニオンの交換を防ぐ意味で、*n*-alkyl iodide を用いた。C₁C₁ から C₁C₈ まですべての化合物の構造は各種機器データ及び元素分析によって確認した。C₁C₉ と C₁C₁₀ は藤岡氏が合成したカウンターアニオンが dibromide のものをそのまま用いた⁹⁷⁾。

Table 2.1. Basic Properties of C₁C_n Iodides and C₁C_n Dibromides

Compound	mp (°C)
C ₁ C ₁ I	145-146
C ₁ C ₂ I	147-148
C ₁ C ₃ I	147-148
C ₁ C ₄ I	147-148
C ₁ C ₅ I	147-148
C ₁ C ₆ I	147-148
C ₁ C ₇ I	147-148
C ₁ C ₈ I	147-148
C ₁ C ₉ Br ₂	147-148
C ₁ C ₁₀ Br ₂	147-148

The mp values were determined by DSC. The mp values were determined by DSC. The mp values were determined by DSC.

第 2 節 C₁C_n 化合物の酸化還元電位

MPP⁺ 誘導体と同様、CH₃CN 中で C₁C₁ から C₁C₁₀ まですべてのパラコートアナログについて酸化還元電位を測定した。得られた酸化還元曲線を Chart 3-2 に、酸化還元電位を Table 3-1 に示す。その結果、パラコートと比較してほとんど変化はなく、-455 mV と -865 mV (vs. SCE) 付近で 1 電子ずつ計 2 電子の可逆的な酸化還元電位が示された。そのためいずれの化合物も細胞内でパラコートと同様の酸化還元特性を示し、同等の活性酸素増産能を発揮する可能性が示された。

Table 3-1 Redox Potentials of C₁C_n Compounds in CH₃CN

compound	E _{1/2} (mV) vs. SCE
C ₁ C ₁ 2I ⁻	-455, -865
C ₁ C ₂ 2I ⁻	-455, -865
C ₁ C ₃ 2I ⁻	-445, -865
C ₁ C ₄ 2I ⁻	-450, -865
C ₁ C ₅ 2I ⁻	-450, -865
C ₁ C ₆ 2I ⁻	-450, -865
C ₁ C ₇ 2I ⁻	-450, -865
C ₁ C ₈ 2I ⁻	-450, -865
C ₁ C ₉ 2Br ⁻	-460, -880
C ₁ C ₁₀ 2Br ⁻	-460, -880

The redox potentials were measured in CH₃CN at 1 mM under argon atmosphere at room temperature with Pt electrode. The half wave potentials (E_{1/2}) versus a saturated calomel electrode (SCE) were determined by cyclic voltammetry.

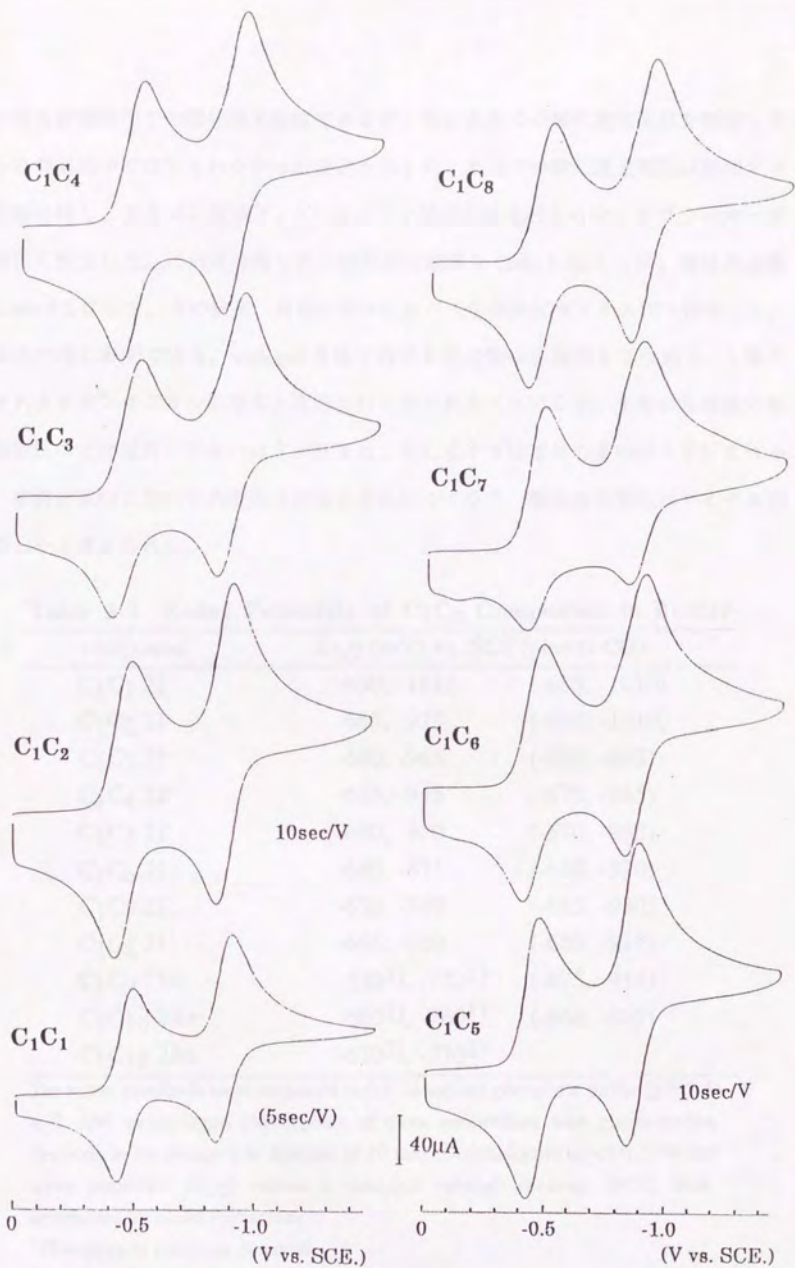


Chart 3-2. Potential Curves of C_1C_n Compounds

以上は有機溶媒中での酸化還元電位であるが、次に水系での酸化還元電位を測定したところ有機溶媒中では見られなかった変化を示した。水系での酸化還元電位は飽和カロメロ電極に対し、アルゴン気流下、0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、グラシーカーボン電極にて測定した。この系で得られた酸化還元曲線を Chart 3-3a, b, c に、酸化還元電位を Table 3-2 に示す。その結果、有機溶媒中に比べて全体的にマイナス側へ移動した。これは次の様に説明できる。viologen 骨格を有する化合物は正電荷を 2 つ持ち、1 電子還元されカチオンラジカルになると電荷は打ち消されることになる。すなわち極性の低い有機溶媒中では電荷の少ないほうが好まれ、逆に水中では電荷の多いほうが好まれるため、有機溶媒中に比べて水中の方が還元されにくくなり、酸化還元電位はマイナス側へ移動したと考えられる。

Table 3-2 Redox Potentials of C₁C_n Compounds in Buffer

compound	E _{1/2} (mV) vs. SCE (plus α-CD)	
C ₁ C ₁ 2I ⁻	-690, -1010	(-685, -1010)
C ₁ C ₂ 2I ⁻	-685, -995	(-690, -1010)
C ₁ C ₃ 2I ⁻	-680, -965	(-680, -985)
C ₁ C ₄ 2I ⁻	-685, -945	(-670, -985)
C ₁ C ₅ 2I ⁻	-680, -910	(-670, -950)
C ₁ C ₆ 2I ⁻	-680, -875	(-680, -930)
C ₁ C ₇ 2I ⁻	-670, -840	(-685, -930)
C ₁ C ₈ 2I ⁻	-665, -820	(-680, -910)
C ₁ C ₉ 2Br ⁻	-630 ¹⁾ , -770 ¹⁾	(-675, -915)
C ₁ C ₁₀ 2Br ⁻	-600 ¹⁾ , -760 ¹⁾	(-660, -905)
C ₁ C ₁₀ 2Br ⁻	-610 ²⁾ , -770 ²⁾	

The redox potentials were measured in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 1 mM under argon atmosphere at room temperature with glassy-carbon electrode in the presence or absence of 10 mM α-cyclodextrin (α-CD). The half wave potentials (E_{1/2}) versus a saturated calomel electrode (SCE) were determined by cyclic voltammetry.

1) The peak of oxidation potential.

2) The peak of oxidation potential in the presence of D-glucose.

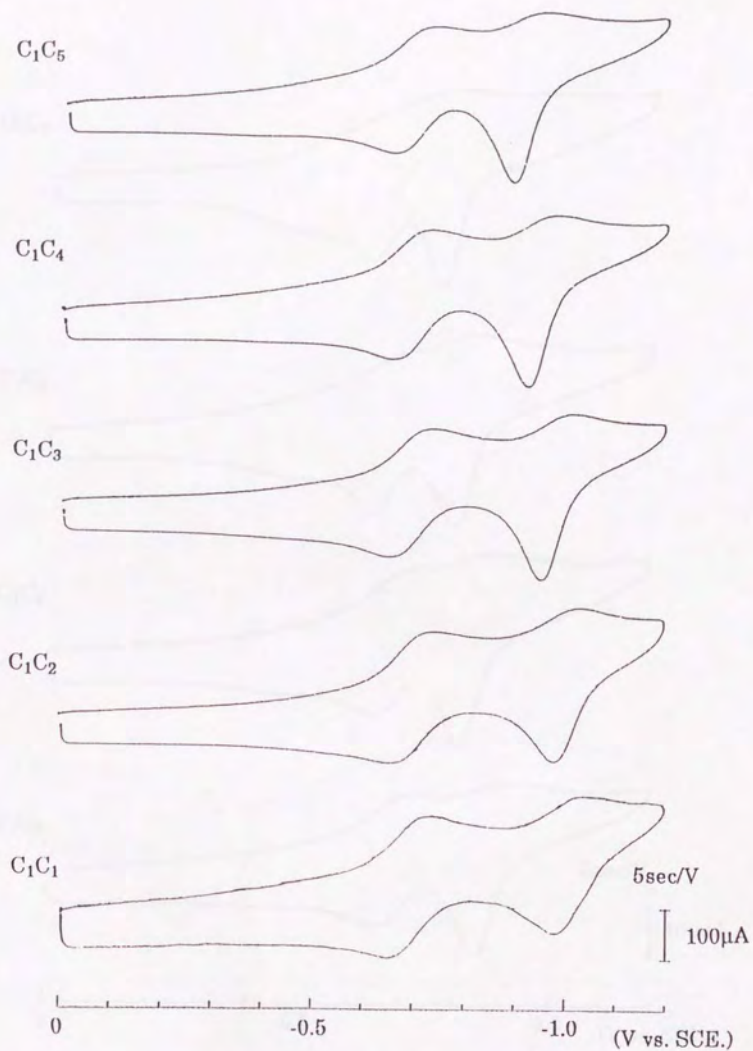


Chart 3-3a. Potential Curves of C_1C_n Compounds

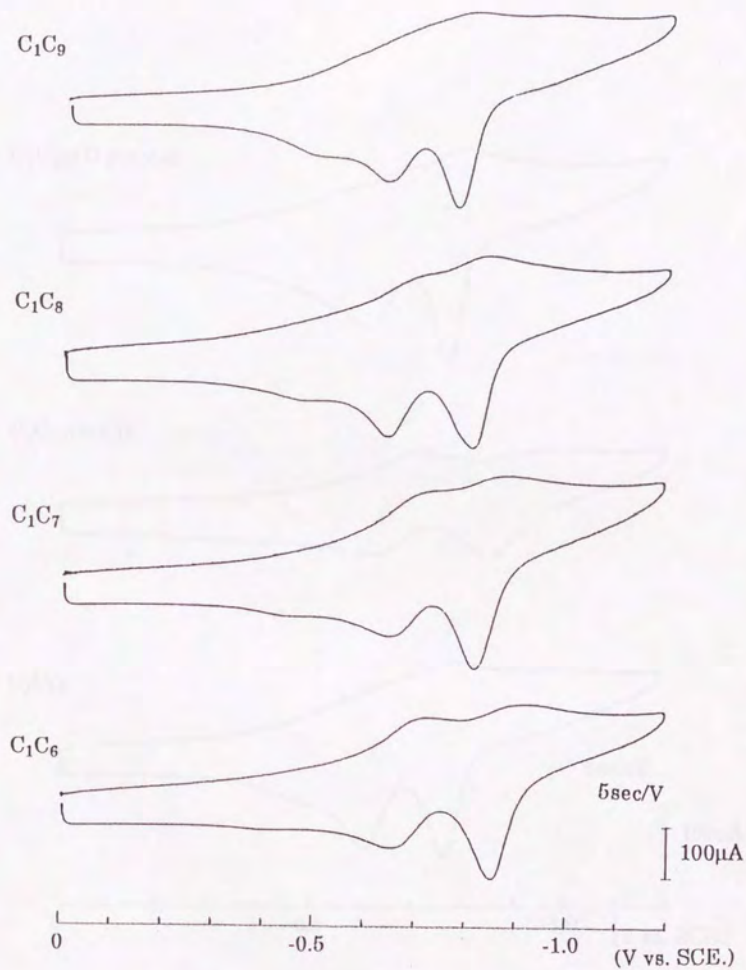


Chart 3-3b. Potential Curves of C_1C_n Compounds

$C_1C_{10}+D\text{-glucose}$



$C_1C_{10}+\alpha\text{-CD}$



C_1C_{10}



5sec/V

100 μ A

0 -0.5 -1.0 (V vs. SCE.)

Chart 3-3c. Potential Curves of C_1C_n Compounds

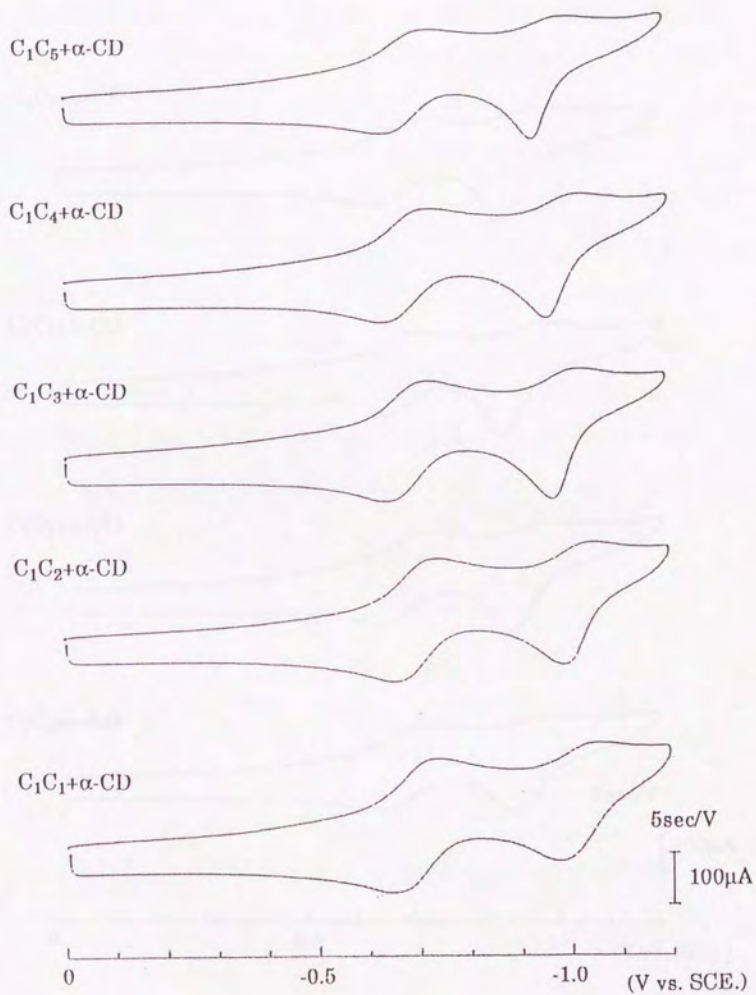
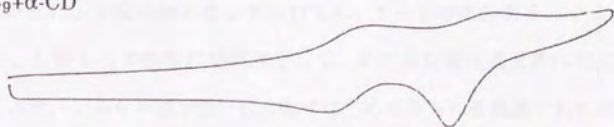
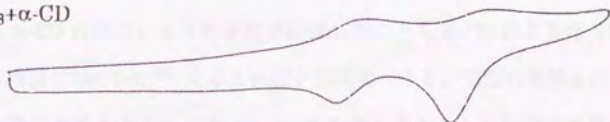


Chart 3-3d. Potential Curves of C_1C_n Compounds

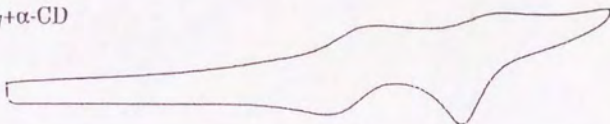
$C_1C_9+\alpha\text{-CD}$



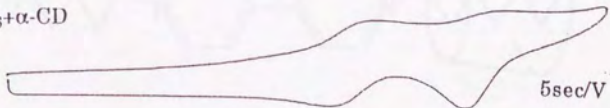
$C_1C_8+\alpha\text{-CD}$



$C_1C_7+\alpha\text{-CD}$



$C_1C_6+\alpha\text{-CD}$



5sec/V

100 μA

0 -0.5 -1.0 (V vs. SCE.)

Chart 3-3e. Potential Curves of C_1C_n Compounds

水中の酸化還元曲線はとくに2電子目の可逆性が低く、しかもこの効果はアルキル鎖が長くなるにしたがって顕著であった。また α -cyclodextrin (α -CD) の添加効果でこの不可逆性は若干回復した (Chart 3-3c, d, e, Table 3-2)。この不可逆性の解釈として当初は化合物の会合により電子の流れに変化が起り、1分子毎の明確な酸化還元波を示さなくなり、 α -CD の添加により化合物の会合が妨げられ、1分子毎の性質を示すようになったと考えていた。しかしこの解釈の疑問点として、不可逆な酸化還元波は C_1C_2 で既に見られていることで、アルキル鎖が長い化合物ではじめてみられる現象であれば良いが、アルキル鎖が2つの化合物で分子間の会合が起きるとは考えにくい。この不可逆性の解釈は化合物の電極に対する吸着に基づくものと考えている。D-glucose の添加では不可逆性に変化がなく α -CD の添加により可逆性が回復したことも α -CD による化合物のアルキル鎖部分での内包 (Chart 3-4) ⁹⁸ を考えれば十分説明できる。実際の実験を行わなかったが、化合物の濃度を低くすることや scan speed を速くすることなどで可逆性が見られれば、この現象は電極への吸着に基づくものであることが分かると思う。

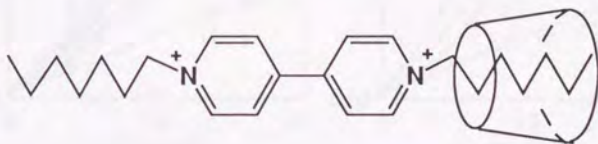


Chart 3-4. C_7C_7 - α -CD Complex (modified according to ref. 98)

第3節 C_1C_n 化合物の活性酸素増産能

MPP⁺ 誘導体と同様、大腸菌(B株、VB₁₂ 要求性)を還元系とする Cyt.c 法を用いて C_1C_n 化合物の活性酸素増産能を測定した。その結果を Fig. 3-1 に示す。すべての化合物が濃度依存的に Cyt.c³⁺ の還元を促進したが、同じ濃度ではアルキル鎖が長くなるにしたがって、促進の度合いが大きくなり、 C_1C_8 を最大に再び軽減した。いずれの還元も SOD で阻害され、すべて活性酸素増産能を示すことが明らかとなった。

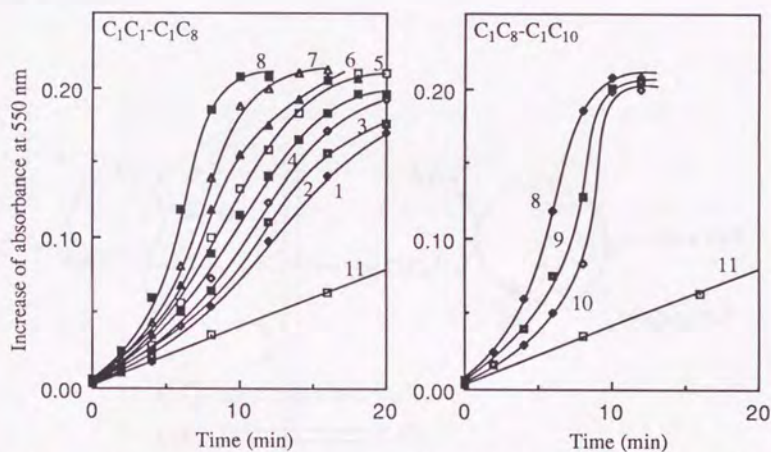
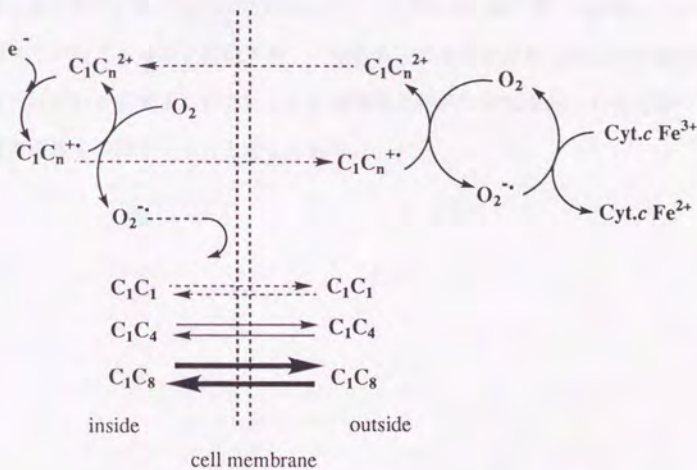


Figure 3-1. Cyt. c reduction mediated by C_1C_n compounds at $10 \mu\text{M}$ under aerobic conditions.

Line 1, C_1C_1 ; line 2, C_1C_2 ; line 3, C_1C_3 ; line 4, C_1C_4 ; line 5, C_1C_5 ; line 6, C_1C_6 ; line 7, C_1C_7 ; line 8, C_1C_8 ; line 9, C_1C_9 ; line 10, C_1C_{10} ; line 11, none.

ここで観測された Cyt.c 還元量の差は、膜の透過性が反映したものと考えられる。
 C_1C_n 化合物による $Cyt.c^{3+}$ の還元は Scheme 3-1 の様に考えられるが、 C_1C_n 化合物は酸化還元電位がほぼ等しく細胞内で酵素によって 1 電子還元され、酸素へ電子を渡す過程に差はないものと考えられる。また、 $O_2^{\cdot-}$ と $Cyt.c^{3+}$ の反応速度は変化しないので、Cyt.c 還元量の増加は細胞外での $O_2^{\cdot-}$ 産生量の増加であると考えられる。すなわちアルキル鎖が長くなることによって、膜の透過速度が上昇し結果として細胞外での $O_2^{\cdot-}$ 産生量の増加につながったものと考えられる。また、 C_1C_9 、 C_1C_{10} で再び軽減したのは、おそらく膜への局在が起きて、細胞質に存在する還元酵素との接触が断たれたかあるいは還元されても細胞外まででてくることができずに $Cyt.c^{3+}$ の還元には至らなかったものと考えられる。



Scheme 3-1. Mechanism of Cyt. c Reduction Pathway and Relative Potency of Penetration of C_1C_n Compounds

第4節 C_1C_n 化合物の大腸菌に対する増殖阻害活性

大腸菌 (B 株、VB₁₂ 要求性) を用いて、MPP⁺ 誘導体と同様、増殖阻害活性を検討した。その結果を Fig. 3-2a, b, c に示す。好氣的条件下での増殖阻害活性はいずれの化合物でも濃度依存性が見られ、その効果を世代時間から比較すると (Table 3-3)、 C_1C_4 で最大となった。この活性の酸素依存性を確認するため、嫌氣的条件下で同様に行ったところ、100 μ M という好氣的条件下の 100 から 1000 倍の濃度でも C_1C_1 から C_1C_7 は大腸菌の増殖に全く影響を与えなかった (Fig. 3-3)。そのためこれらの化合物による増殖阻害活性は酸素依存的なものと結論することができる。 C_1C_8 から C_1C_{10} は嫌氣的条件下でも大腸菌の増殖を阻害した (Fig. 3-3)。この酸素非依存的な活性は濃度依存적でしかもアルキル鎖が長くなるにしたがって強まっていく傾向を示した (Fig. 3-4)。また大腸菌の増殖曲線に化合物の 1 電子還元体であるカチオンラジカル由来の青い色が被っているが、培養液の濁りが消える現象が観察され、この酸素非依存的な活性は界面活性様作用が現われたのではないかと考えられた。これら酸素非依存的な活性を示した化合物でも低濃度では酸素毒性を発揮するものと考えられる。

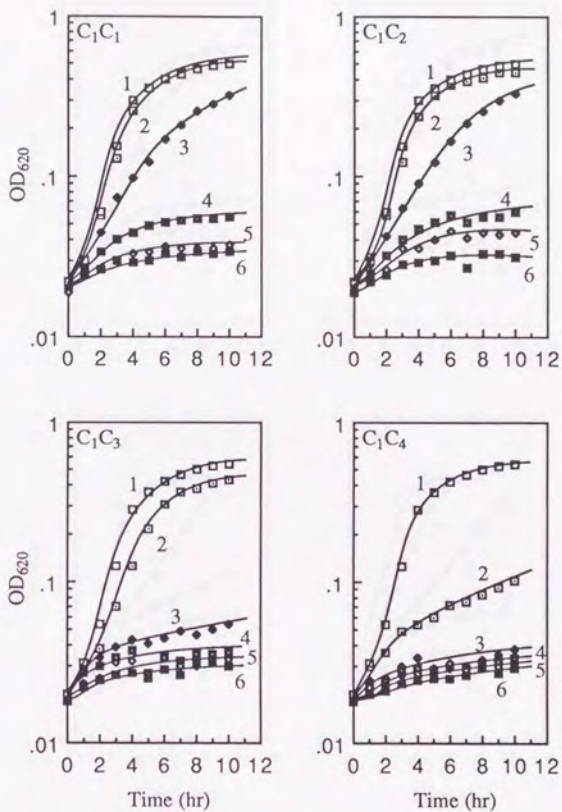


Figure 3-2a. Effects of C₁C_n compounds (n=1-4) on *E. coli* growth under aerobic conditions.

E. coli was grown in GM medium containing each compound at the following concentrations; Line 1, none; line 2, 0.1 μM; line 3, 0.3 μM; line 4, 1.0 μM; line 5, 3.0 μM; line 6, 10 μM.

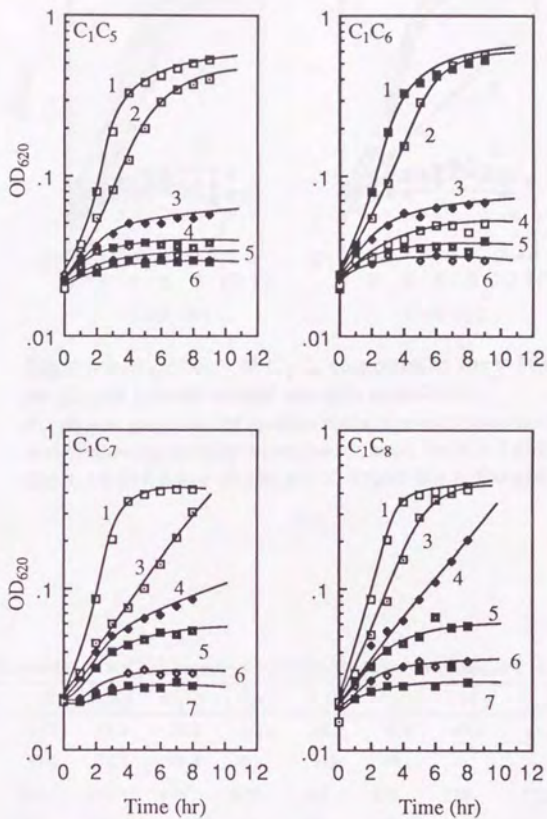


Figure 3-2b. Effects of C₁C_n compounds (n=5-8) on *E. coli* growth under aerobic conditions.

E. coli was grown in GM medium containing each compound at the following concentrations; Line 1, none; line 2, 0.1 μ M; line 3, 0.3 μ M; line 4, 1.0 μ M; line 5, 3.0 μ M; line 6, 10 μ M; line 7, 30 μ M.

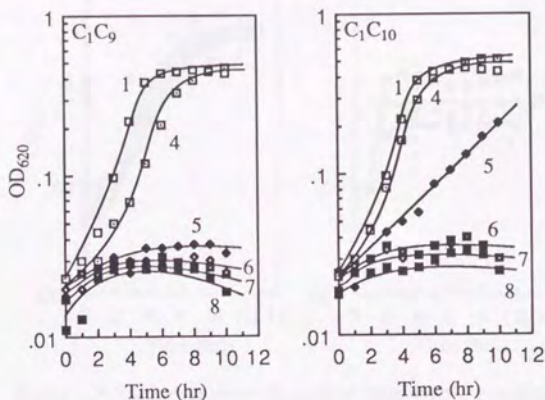


Figure 3-2c. Effects of C_1C_n compounds ($n=9-10$) on *E. coli* growth under aerobic conditions.

E. coli was grown in GM medium containing each compound at the following concentrations; Line 1, none; line 4, 1.0 μM ; line 5, 3.0 μM ; line 6, 10 μM ; line 7, 30 μM ; line 8, 100 μM .

Table 3-3 Generation Time^{a)} of Aerobic *E. coli* Growth in the Presence of C_1C_n Compounds

conc. (μM)	C_1C_1	C_1C_2	C_1C_3	C_1C_4	C_1C_5	C_1C_6	C_1C_7	C_1C_8	C_1C_9	C_1C_{10}
none	51.3	51.3	50.2	50.2	50.8	50.8	43.6	43.6	52.7	52.7
0.1	57.3	72.1	71.8	205	99.6	79.1	---	---	---	---
0.3	123	117	476	899	261	215	150	73.0	---	---
1.0	392	288	n.g. ^{b)}	n.g.	660	363	314	151	86.1	67.6
3.0	511	455	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	330	300	494	187
10	930	783	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	487	829	n.g.	867
30	--- ^{c)}	---	---	---	---	---	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
100	---	---	---	---	---	---	---	---	n.g.	n.g.

^{a)} Unit of generation time is minute.

^{b)} No growth. (generation time; >1000 min.)

^{c)} Not tested.

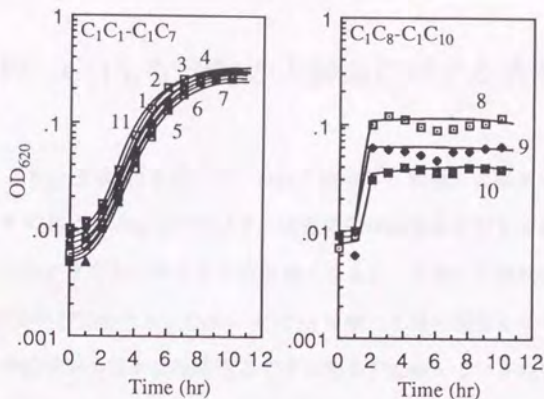


Figure 3-3. *E. coli* growth under anaerobic conditions.

E. coli was grown in GM medium containing C_1C_n compounds at 100 μ M. Line 1, C_1C_1 ; line 2, C_1C_2 ; line 3, C_1C_3 ; line 4, C_1C_4 ; line 5, C_1C_5 ; line 6, C_1C_6 ; line 7, C_1C_7 ; line 8, C_1C_8 ; line 9, C_1C_9 ; line 10, C_1C_{10} ; line 11, none.

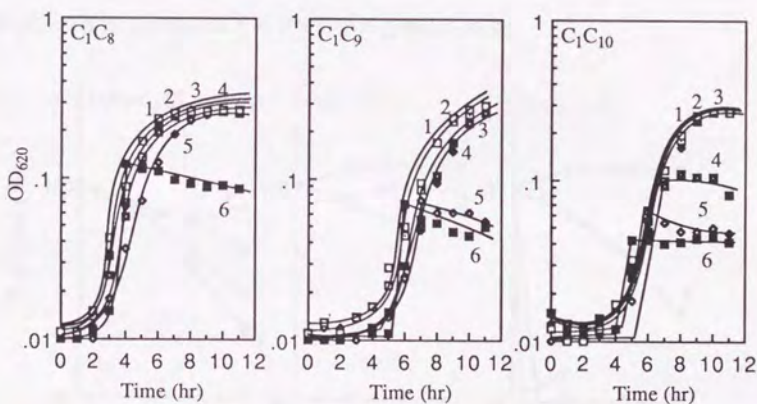


Figure 3-4. Effects of C_1C_n compounds ($n=8-10$) on *E. coli* growth under anaerobic conditions.

E. coli was grown in GM medium containing each compound at the following concentrations; Line 1, none; line 2, 1.0 μ M; line 3, 3.0 μ M; line 4, 10 μ M; line 5, 30 μ M; line 6, 100 μ M.

第5節 C_1C_n 化合物の大腸菌に対する致死活性

大腸菌(B株, VB₁₂要求性)を用いて、MPP⁺誘導体と同様、大腸菌に対する致死活性を検討した。その結果をFig. 3-5に示す。致死活性は酸素依存的な増殖阻害活性とは異なる結果を示した。すなわちアルキル鎖が長くなるにしたがって致死活性は軽減し、 C_1C_7 以上で再び活性が現われた。 C_1C_9 、 C_1C_{10} は極めて強い活性を示した。アルキル鎖が短いほうで増殖阻害活性と致死活性とでその効果が逆転しているのは、その方法の違いに起因すると考えられた。詳しくは後述するが、致死活性においては化合物の脂溶性の高まりによって、一旦取り込まれた化合物が希釈、プレーティングの際に細胞外へ漏出してしまうため、アルキル鎖が長くなるにしたがって活性が軽減したものと考えられる。また、アルキル鎖の長いほうで再び致死活性が現われたのは、致死活性を見る際には化合物を高濃度で接触させることと合わせて考えると、酸素非依存的な活性すなわち、界面活性様作用が現われたのではないかと考えられる。

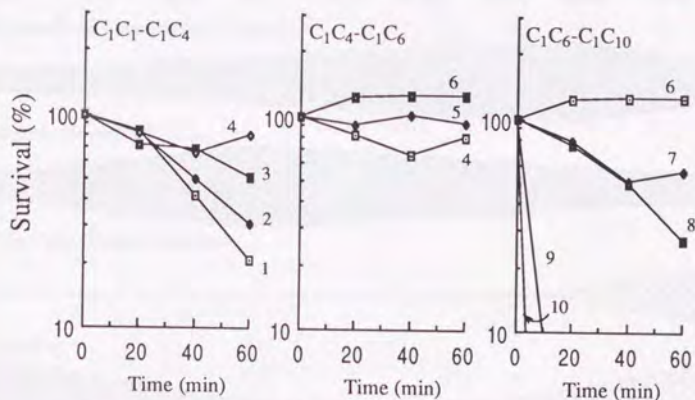


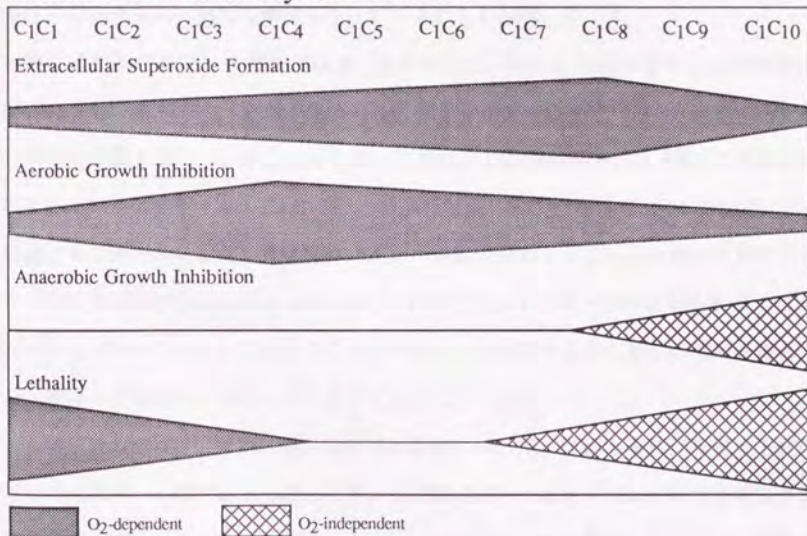
Figure 3-5. Lethal effects of C_1C_n compounds.

The conditions were according to ref. 89. The reaction media contained the following additives (500 μ M): line 1, C_1C_1 ; line 2, C_1C_2 ; line 3, C_1C_3 ; line 4, C_1C_4 ; line 5, C_1C_5 ; line 6, C_1C_6 ; line 7, C_1C_7 ; line 8, C_1C_8 ; line 9, C_1C_9 ; line 10, C_1C_{10} .

第6節 結論と考察

第3章で得られた結果を Chart 3-5 にまとめた。アルキル鎖長のことなるパラコートアナログ C_1C_n 化合物 ($n=1-10$) は、いずれも活性酸素増産能を示した。すべての化合物に大腸菌の増殖阻害活性が認められたが、 C_1C_1 から C_1C_7 は酸素依存的な増殖阻害活性が主な作用であるのに対し、 C_1C_8 から C_1C_{10} には高濃度で酸素非依存的な活性を示すようになることが分かった。後者の化合物による作用は致死活性が極めて強く、嫌気的条件下での検討から界面活性様作用ではないかと推測しているが、パラコートによる酸素毒性とは根本的に異なる作用によると考えられる。アルキル鎖の炭素数が8以下の化合物ではほとんどミセルを形成していないということ⁹⁹⁾が一般的に指示されており、酸素非依存的な活性を示した化合物の限界に近いことは興味深い結果である。

Chart 3-5. Summary of Section 3



酸素依存的な毒性発現という意味においては、アルキル鎖を4まで伸ばすことによってパラコートより強い増殖阻害活性を示すことができた。これは Cyt.c 法でも見られたように、膜の透過性が増したために $O_2^{\cdot -}$ 産生量が増加したことによると考えられる。細胞外での $O_2^{\cdot -}$ 産生量と生物活性には必ずしも相関がないことは第1章のベンゾフラゼン類との比較で述べた。 $C_{12}C_{14}$ 化合物は細胞外での $O_2^{\cdot -}$ 産生量が増えただけでなく、細胞内での $O_2^{\cdot -}$ 産生量も増えたために活性の増強が見られたものと考えられる。また、単に細胞内での $O_2^{\cdot -}$ 産生量が増えただけでなく、パラコートの活性発現に必要な別の要因(標的分子との相互作用など)も保持していたためと考えられる。この別の要因は明らかではないが、化合物全体で2価のカチオンであることや、カチオンラジカルの安定性、適度な水溶性などが関係しているものと考えている。アルキル鎖が5以上で再び酸素依存的な増殖阻害活性が軽減していったことは極めて重要な示唆を与えていると思われる。すなわち細胞外での活性酸素産生量は増加していくのに酸素依存的な増殖阻害活性は弱まっていた。このことは細胞内での化合物の局在が細胞に対し、効果的な酸素毒性を発揮するのに重要な要因となっていることを示唆している。

動物に対するパラコート毒性では肺に集積性が見られる。これは肺の type II 細胞の polyamine uptake 機構にのり蓄積されるためと考えられている(100-102)。大腸菌に対するパラコートの取り込みは、D-glucose によって促進され能動輸送される(15)。この取り込みはカチオン性の無機イオン(Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} など)、塩濃度、pH の低下によって軽減される(13-15)。また、大腸菌のパラコート耐性株の1つは uptake 能の欠如によること(103)、大腸菌の polyamine transporter の1つに対しパラコートが親和性を示すこと(104,105)も分かっている。これらのことはパラコートの取り込みに対し、他の薬物とは異なる特別な作用機序が存在していることを示している。

ここで用いた $C_{12}C_n$ 化合物は放射能ラベル体がないので、後述する抗パラコート抗体を用いて細胞内への取り込みを検討した。まだ満足のいく結果ではないのでその定性的な結果について述べる。 $C_{12}C_1$ 、 $C_{12}C_4$ 、 $C_{12}C_7$ 、 $C_{12}C_{10}$ について検討したところ、他の3つの化合物に比べて $C_{12}C_{10}$ の細胞内濃度は10倍高く、mM オーダーの値を示した。経

時変化についても検討したところ、 C_1C_1 は時間と共に値が上昇したのに対し、他の3つの化合物は5分程度ですでに飽和していた。推測の域を過ぎないが、アルキル鎖が長くなるに従って脂溶性が増すと、上記の機構にのらなくなり受動輸送になるのではないかと考えられた。 C_1C_{10} になると膜への移行性が高くなり他の化合物よりも細胞内濃度が高く見られたものと考えられる。さらなる検討を重ね生物活性との相関や、一旦取り込まれた化合物の抜け易さなども表現できればと考えている。

嫌気的条件下での増殖阻害活性において、酸素非依存的な活性が見られたときにのみ濁度に化合物の1電子還元体であるカチオンラジカル由来の青い色が被っているが、なぜアルキル鎖の短い化合物ではこの現象が見られないのであろうか。嫌気的に培養した場合であっても大腸菌はバラコート還元できるだけの能力は持っている。しかし酸素がないため1電子還元体はその電子を渡す相手がないと考えられる。それならばアルキル鎖の短い化合物であっても青い色が濁度に被ってくるであろう。ところが増殖が見られたときには青い色が見られず、増殖が抑制されたときのみ青い色が見られることから、大腸菌はバラコートアナログの1電子還元体を電子供与体として営むシステムを持っていると考えられる。アルキル鎖の長い化合物によって細胞が破壊され、細胞成分が無秩序になってしまうとこのシステムが機能することができずにカチオンラジカルが安定に存在し、その結果濁度に青い色が被ってきたものと考えられる。

致死活性においては増殖阻害活性とは異なり、酸素依存的な活性と思われる C_1C_1 から C_1C_6 はアルキル鎖が長くなるにしたがって、活性が軽減する傾向を示した。ここで増殖阻害活性と致死活性のその方法の違いを議論してみたい。増殖阻害活性は培地中に常に化合物が存在し、バラコートのような代謝されにくい化合物は測定時間中安定に存在する。それに対し致死活性においては、一定時間大腸菌を化合物と接触させた後、希釈、プレーティングなどによって化合物は細胞内に取り込まれたもののみが存在することになる。Fridovich らによって、バラコートによる致死活性は大腸菌が化合物に接触した直後に現われるのではなく、プレート上でコロニーを形成する際に現われることが示されている (14,15)。また、大腸菌 B 株と K-12 株との比較から、バラコートは B 株には

保持されるが K-12 株には保持されず、希釈操作等によって細胞外へ抜け出てしまい、結果として K-12 株では致死活性が見られないと報告している (14,15)。以上のことを考えると致死実験では、脂溶性の高い化合物は一旦取り込まれても、希釈、プレートイングの際に細胞外へ漏出し、増殖阻害活性を示したときとは同じ効果を発揮することができないと考えられる。すなわち致死活性は細胞内に取り込まれた化合物が、プレート状でコロニーを形成する際に効果を発揮していると考えられる。そのため致死活性とはいつでもプレート上での増殖阻害活性である可能性が高い。ベンゾフラザン類、ヘテロペンタレン類、第 1 章で述べた MPP⁺ 誘導体など酸素毒性を示した化合物が致死活性を示すに至らなかった原因の一部はこのことに由来するものと考えられる。プレート上での assay は 24 時間後のコロニー数で比較しているが、これを数日に延ばしてコロニーが見えてくれば、増殖阻害効果と言えるのではないだろうか。

第4章

パラコート類縁化合物の酸化還元特性に与える

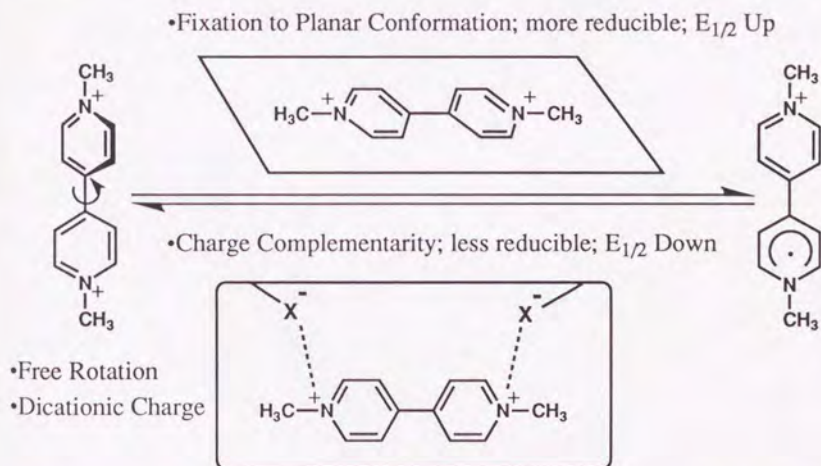
抗パラコート抗体の効果

前章までに酸素毒性における化合物の酸化還元特性の重要性を示してきたが、序章でも述べたとおり、酸化還元電位は電子の流れを規定する1つの尺度である。一定条件下で化合物の酸化還元電位は変化しないと考えられるが、周囲の環境の変化によって化合物の酸化還元特性は大きく変化する。例えば、電子伝達系のシトクロム成分のなかには、同じヘムを内包しながらその酸化還元電位の異なるものが存在する。この原因はタンパク質のもたらす「環境」の違いに由来すると言われている。この「環境」とはいったいどのようなものなのか、またその「環境」の違いによって化合物の酸化還元電位はどの程度変化するものなのかに興味をもたれた。

パラコートはその酸化還元特性について最も良く検討されている化合物の一つである。またモノクローナル抗体は高い認識力をもって、しかも単一分子種として得られるタンパク質である。これらの点から、パラコートを標的化合物、モノクローナル抗体をアポタンパク質のモデルとして用いれば、タンパク質の作る「環境」の違いが酸化還元特性の変化にもたらす影響を明らかにできるのではないかと考えた。

第1節 抗パラコート抗体調製のためのコンセプト

パラコートの酸化還元特性に影響を及ぼす構造的要因は2つある (Scheme 4-1)。1つは2つの芳香環をつなぐ結合で自由回転が可能であることである。この回転を平面に固定することは、1電子還元されたときのラジカルの非局在化を高め安定化する。すなわちパラコートは還元され易くなり、酸化還元電位はプラス側へ変化する。この根拠として次の様な事象が挙げられる。パラコートのように biphenyl 骨格を持つ化合物は、平面から約 30 度ねじれた状態でエネルギー的に安定であるが¹⁰⁶⁾、パラコートは1電子、2電子と還元されるに従って平面性が高まる¹⁰⁷⁾。パラコートの2電子還元体は quinoid form (leuco form) と呼ばれ、完全な平面である¹⁰⁸⁾。また MPP⁺ について、2つの芳香環のなす角度を変化させたときのエネルギー状態の変化に関する計算がなされている¹⁰⁹⁾。この場合、MPP⁺ の酸化還元電位は LUMO と相関があると考えられるが、計算結果から 0 度の時と 90 度の時では酸化還元電位が約 300 mV 異なり、平面の時が最も還元



Scheme 4-1. Concept of Effects on Redox Property of Paraquat

され易い。以上のことは、自由回転可能な化合物が平面に固定されると、還元され易くなることを示唆している。

もう1つの要因として、パラコートは化合物全体で2価のカチオンである点が挙げられる。このジカチオンに対し静電的相互作用が存在すると、化合物の電子密度は高まり、パラコートは還元されにくくなり、酸化還元電位はマイナス側へ変化すると考えられる。

このような概念に基づいたハプテン抗原をデザインし、モノクローナル抗体を調製すれば、タンパク質による認識様式と酸化還元特性の変化をうまく説明できるのではないかと考えた。



第2節 ハプテンのデザインと合成

上記の概念に基づき、バラコート骨格を含みかつ平面性を持つ化合物 Hapten をデザインした (Chart 4-1)。3,8-phenanthroline 骨格を直鎖アルキル鎖の spacer 部分を介し、末端のカルボキシル基を活性エステル法にてキャリアタンパク質へ結合させるように考えた。自由度の高い spacer を介することで、モノクローナル抗体の認識部位にキャリアタンパク質の影響がでにくくなると考えられた。合成は Scheme 4-2 に従い、Hapten の構造は各種機器データ及び元素分析にて確認した。

合成した Hapten をキャリアタンパク質である keyhole limpet hemocyanin (KLH) と bovine serum albumin (BSA) に結合した。Hapten に特異的な吸収スペクトル (λ_{\max} ; 389 nm) から結合を確認したところ、その結合比 (Hapten/carrier protein) はそれぞれ 460 と 12 だった。Hap-KLH は免疫用に、Hap-BSA は抗体の screening 及び、その後の assay に用いた。

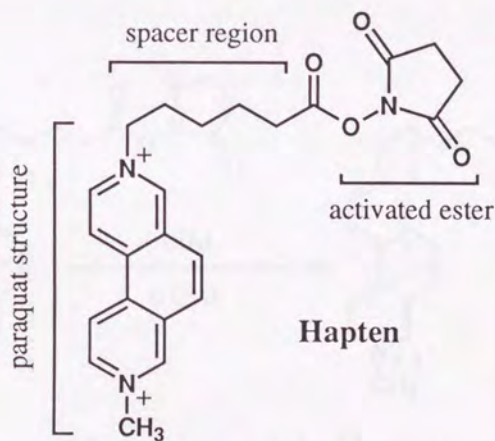
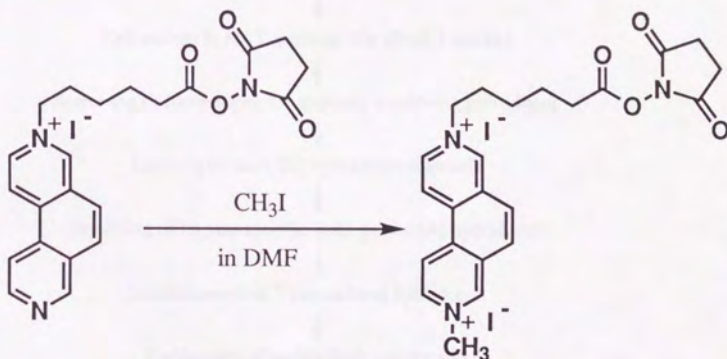
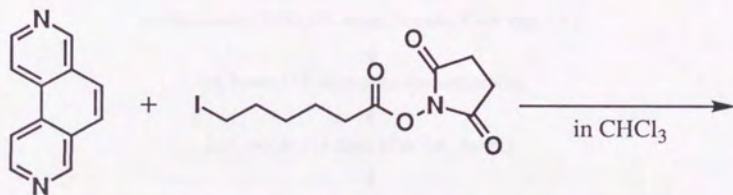
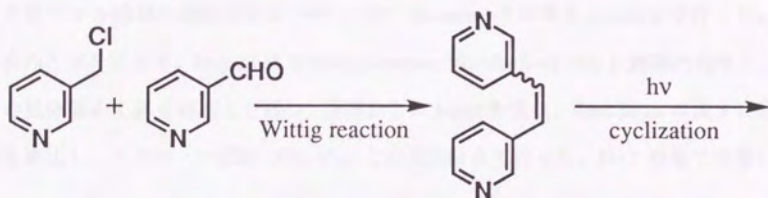


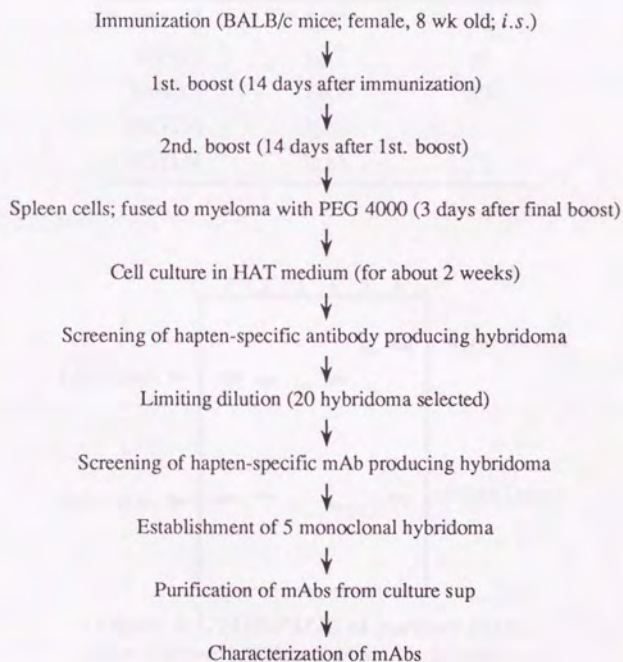
Chart 4-1. Structure of the Hapten



Scheme 4-2. Synthesis of the Haptent

第3節 パラコートを認識するモノクローナル抗体の 調製

モノクローナル抗体の調製は常法 (110) に従い Scheme 4-3 に示す schedule で行った。概略は次のとおりである。Hap-KLH を BALB/c mouse (female; 8 wk old) に脾臓内投与し、血清中の抗体価の上昇を確認した後、2 週間おきに boost を重ね、final boost の後 3 日後に脾臓を摘出し、ミエローマ細胞 (X63.653) との細胞融合を行った。HAT 培地で培養し



Scheme 4-3. Preparation of Monoclonal Antibodies (mAbs)

つつ、Hapten に特異的な抗体を産生するハイブリドーマを選択し、限外希釈を行い、パラコートの特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞を確立した。それぞれを大量培養し、その培養上清から IgG は protein A や protein G の affinity column を用いて、IgM は濃縮後、ゲルろ過を用いて精製した。2 次抗体を用いて得られた抗体の class、subclass を確認し (Table 4-1)、SDS-PAGE によってその純度を確認した (Fig. 4-1)。また、Lowry 法⁹¹⁾によりタンパク定量を行った。以上の結果、3 種の IgG と 2 種の IgM を得た。

Table 4-1 Characteristics of Purified mAbs

mAb	class	subclass
MA1G	IgG	γ 2a
MF1G	IgG	γ 1
MB2G	IgG	γ 2b
MG1M	IgM	
MH1M	IgM	

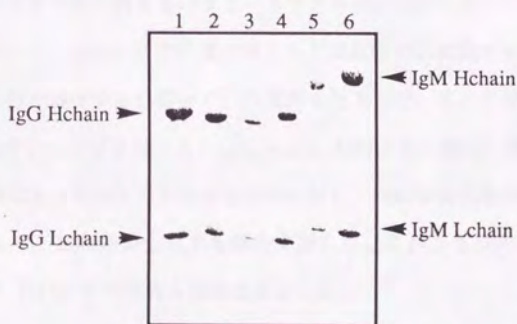


Figure 4-1. SDS-PAGE of purified mAbs.
Lane 1; known IgG, lane 2; MA1G, lane 3; MF1G,
lane 4; MB2G, lane 5; MG1M, lane 6; MH1M.

第4節 抗パラコート抗体の認識様式

得られた3種のIgGについて、ELISA法の結合阻害実験から、それぞれの認識様式について検討した。市販のもの及び別途合成した約50種のHaptenアナログ、パラコートアナログ及びそれらの前駆体などを用いた。抗原にはHap-BSAを用い、化合物を加えないときのモノクローナル抗体の結合を100%とし、化合物を加えたときの50%阻害濃度を IC_{50} として評価した。その結果をFig. 4-2a-dに示す。縦軸は $-\log[IC_{50}]$ で示してある。

3種のIgGはいずれもHaptenのアナログである3,8-dimethyl-3,8-phenanthrolineに對し、1-3 nMと高い親和性を示した。Fig. 4-2aに示すとおり、平面性という観点から見ると、MF1Gは3環性の化合物に対しほとんど認識力の差がないのに対し、MA1Gは大きな差を示した。カチオンの位置に関しても、MF1Gはその許容範囲が広いのに対し、MA1Gは許容範囲が狭いと考えられる。MB2Gはこれら2つの点に関して、MA1GとMF1Gの中間的な認識能を示した。

Fig. 4-2bは、カチオン性の異なるパラコートアナログについて比べてある。カチオン性のあるなしについて、MF1Gはその差がほとんど認識能の差に現われないのに対し、MA1Gはカチオン性が減少するに従って、認識能も低下した。また平面性を取りえないパラコートアナログについて比較すると(Fig. 4-2c)、MF1Gは全般的に親和性が低いが、カチオン性の違いによってほとんど差がないのに対し、MA1Gは化合物のカチオン性が高まるにしたがって、親和性が上昇する傾向を示した。これら2つの点に関しても、MB2GはMA1GとMF1Gの中間的な認識能を示した。

また、spacer部分に対する認識能を比較すると(Fig. 4-2d)、MA1Gはspacer部分によってほとんど親和性の変化を示さないのに対し、MB2GとMF1Gは10倍から100倍、親和性の上昇が見られた。電荷的に中性の化合物に対しては、 $100\mu\text{M}$ でも IC_{50} を示すものはなかった。すなわち $-\log[IC_{50}]$ で4以下であった。

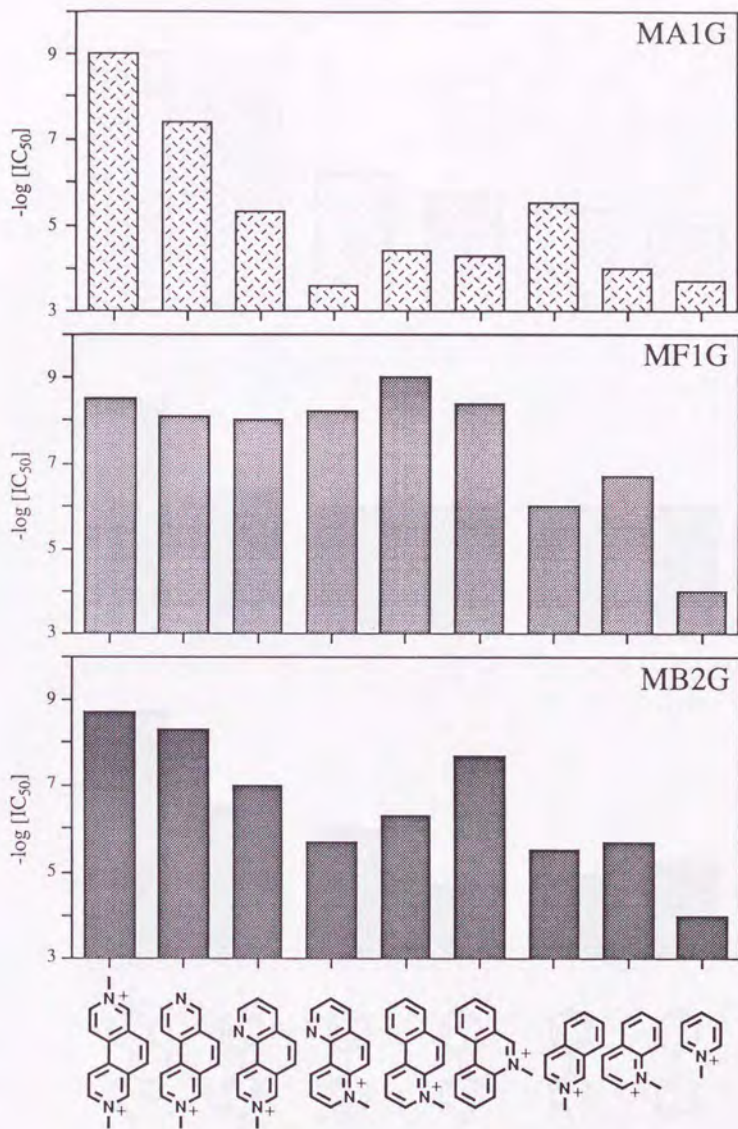


Figure 4-2a. Recognition pattern of mAbs (planarity and cation site difference).

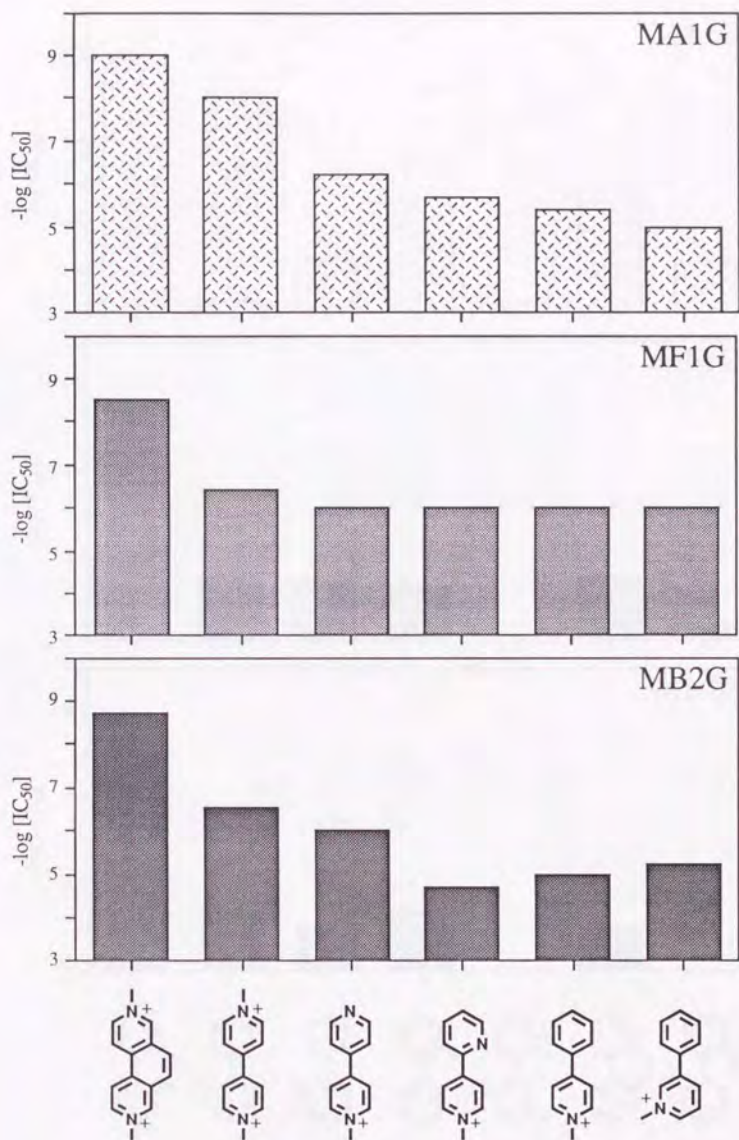


Figure 4-2b. Recognition pattern of mAbs (charge difference of free rotated compounds).

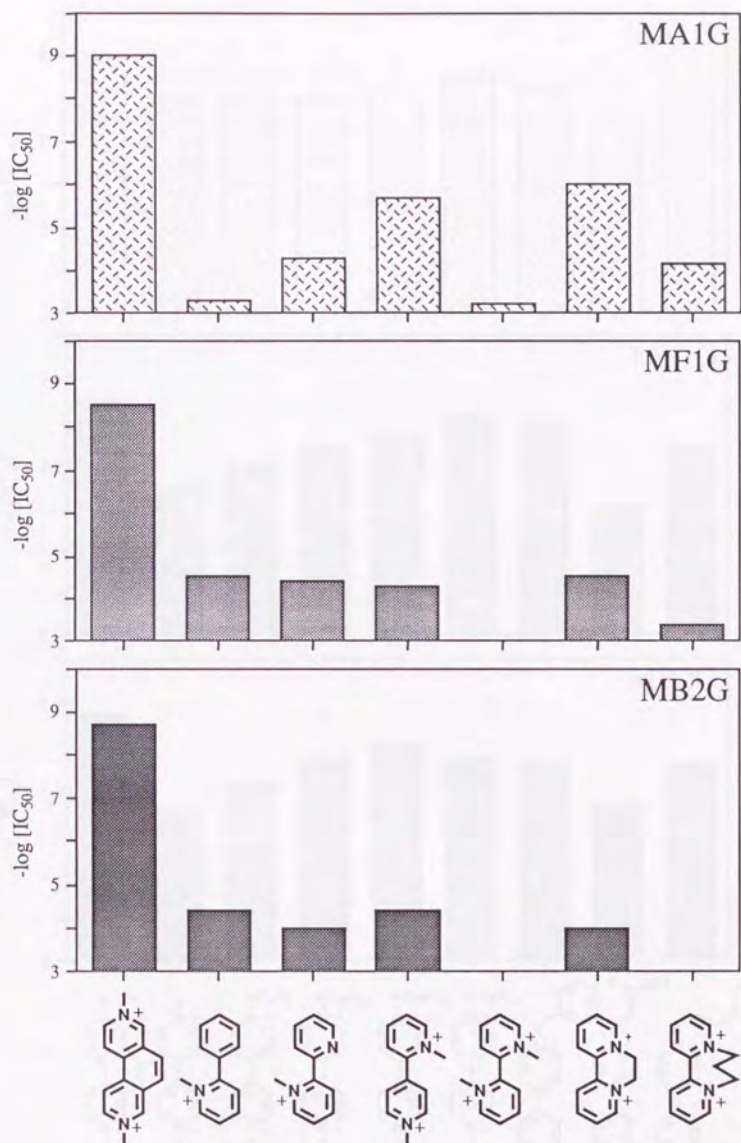


Figure 4-2c. Recognition pattern of mAbs (charge difference of non-planar compounds).

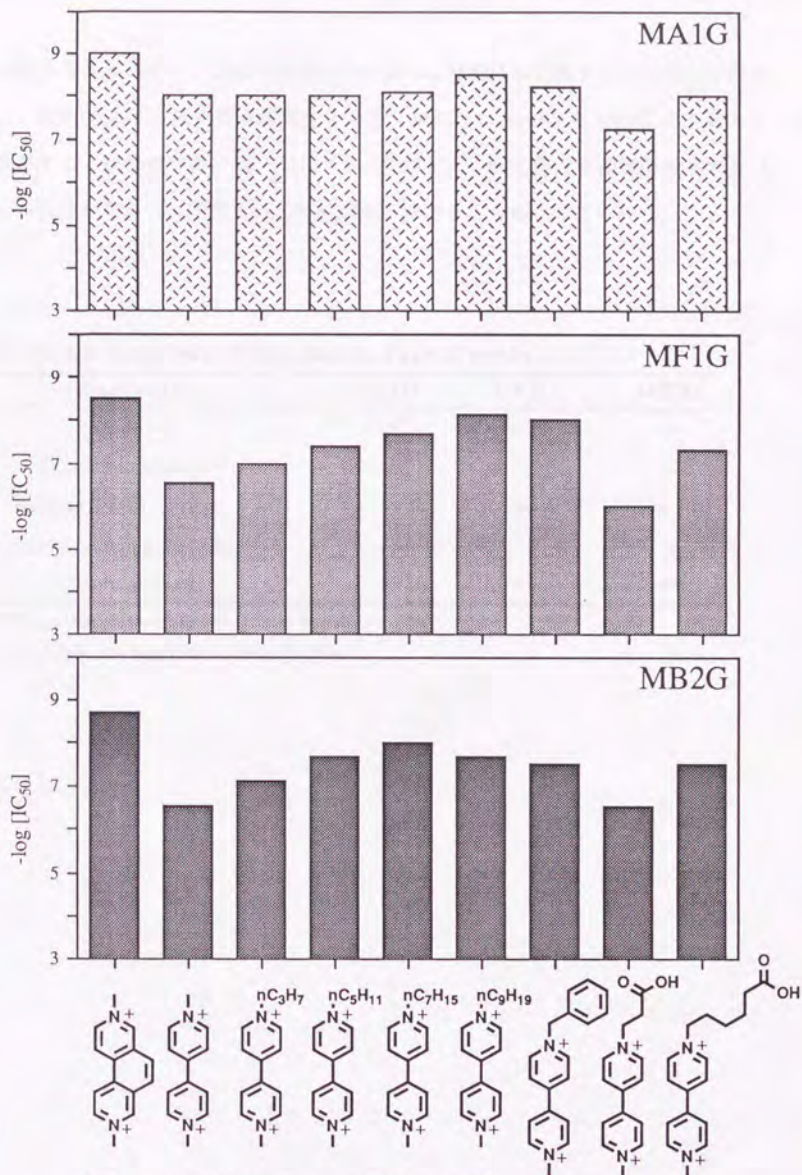


Figure 4-2d. Recognition pattern of mAbs (spacer region difference).

以上の結果をまとめると、Table 4-2 のようになる。MA1G はジカチオンに対し特異的に認識し、MF1G は平面性を強く認識すること、MB2G は MA1G と MF1G の中間的な認識能を示すことが分かった。同一のハプテンに対し、これら異なる認識能を示すモノクローナル抗体が得られ、活性との比較検討が十分できるものと考えられた。

Table 4-2 Summary of Recognition Type of mAbs

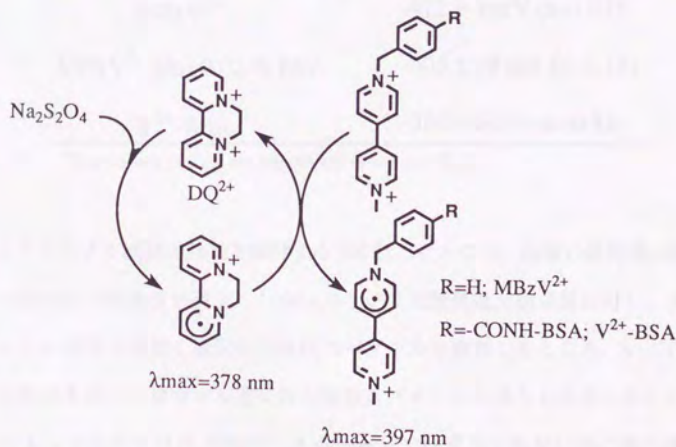
characteristics	MA1G	MF1G	MB2G
planarity	+ ^{a)}	+++	++
dicationic charge	+++	+	+
monocationic charge	+	++	++
precision of cation site	++	±	+
spacer region	±	++	++

^{a)}This table shows relative affinity between mAbs;

+++; high; ++, medium; +, low; ±, little.

第5節 パラコート類縁化合物の酸化還元特性に与える 抗パラコート抗体の効果

パラコートの酸化還元特性に与える抗パラコート抗体の効果を検討する目的で、酸化還元滴定法を確立した¹¹¹⁾。比較的酸化還元電位が近い、methyl benzyl viologen (MBzV²⁺) と diquat (DQ²⁺) を酸化還元指示薬として、dithionite (Na₂S₂O₄) を還元剤として用いた (Scheme 4-4)。酸化還元滴定を行う条件下、サイクリックボルタムメトリーによって両者の酸化還元電位を測定したところ、MBzV²⁺ と DQ²⁺ の酸化還元電位はそれぞれ -387 mV (vs. NHE)、-365 mV (vs. NHE) の値が得られた。滴定は 3 μM の MBzV²⁺ と DQ²⁺ を含む PBS (pH 7.4) を脱気し、50 mM の dithionite 溶液を少量ずつシリンジで加え、吸収スペクトルの変化を追跡した。



Scheme 4-4. Redox Titration between Diquat (DQ²⁺) and Viologens (V²⁺)

両者の還元体の ϵ 値から酸化体、還元体の比を求め *Nernst* の式に代入し、

Nernst equation

$$2.303 RT/nF \log[DQ^{2+}_{ox}]/[DQ^{2+}_{red}] + E_{1/2}(DQ^{2+}) =$$

$$2.303 RT/nF \log[V^{2+}_{ox}]/[V^{2+}_{red}] + E_{1/2}(V^{2+})$$

DQ^{2+} の酸化還元電位を -365 mV として $MBzV^{2+}$ の酸化還元電位を算出した。その結果を Table 4-3 に示す。タンパク質を加えない系では、 $MBzV^{2+}$ の酸化還元電位は -412 mV (vs. NHE) と算出された。比較として行った BSA を添加した系、BSA に viologen を共有結合させた系では、タンパク質を加えない系と比べて大きな変化はなかった。

Table 4-3 Redox Potentials of Viologens Calculated by *Nernst Equation*

viologens	$E_{1/2}$ vs. NHE
$MBzV^{2+}$	-412 ± 9 mV (n=1.07)
$MBzV^{2+}$ plus 0.02 % BSA	-405 ± 10 mV (n=1.13)
V^{2+} -BSA	-386 ± 6 mV (n=0.83)

The values of $E_{1/2}$ are expressed as mean \pm S.D.

次にモノクローナル抗体の効果を検討するべく行ったところ、抗体の添加量に従って、 $MBzV^{2+}$ の還元体の吸光度が減少した (Fig. 4-3)。また酸化還元指示薬に対し、少過剰のモノクローナル抗体を添加し還元体の吸収スペクトルを観察したところ、いずれのモノクローナル抗体を用いた場合でも還元体の吸収スペクトルは見られなかった。この結果は、抗体によって認識された $MBzV^{2+}$ は dithionite では還元されないほど酸化還元電位がマイナス側へ変化したものと考えられる (Scheme 4-5)。このことは当初予想した平面性の認識よりも、静電的相互作用の寄与が大きく、化合物の電子密度が上昇した結果であると考えられる。

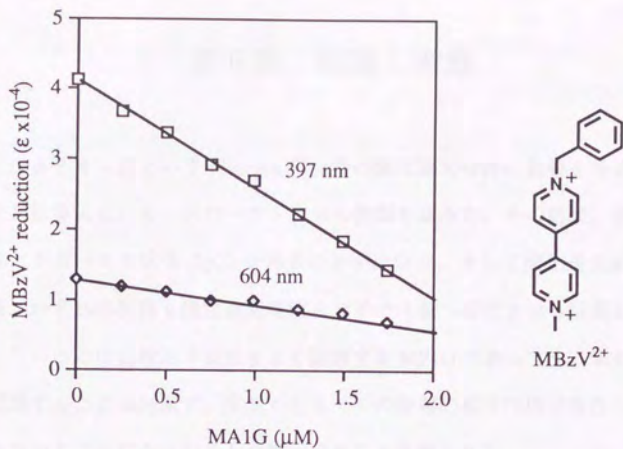
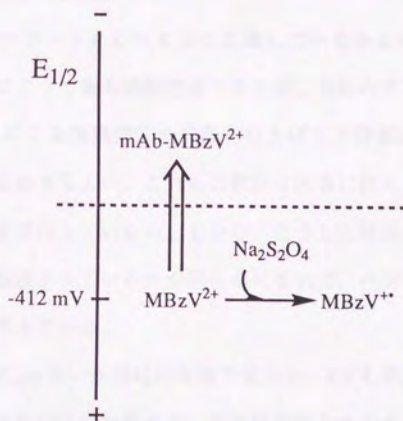


Figure 4-3. Effect of mAb (MA1G) on MBzV²⁺ reduction by dithionite. Viologen reduction was monitored at 397 and 604 nm by measurement of cation radical formation in 10 mM phosphate buffer saline (pH 7.4) under anaerobic conditions at 25 °C. A small aliquot of 50 mM dithionite solution was added to 1.8 ml of the reaction mixtures, containing 3 μM MBzV²⁺ and adequate concentration of mAbs.



Scheme 4-5. Schematic Representation of mAb Effect on MBzV²⁺ Reduction

第6節 結論と考察

平面性とジカチオン性という viologen 化合物の酸化還元特性に影響を与える2つの要因をハプテンに導入し、モノクローナル抗体の調製を試みた。その結果、認識能の異なる3種のモノクローナル抗体 (IgG) を得ることが出来た。そして酸化還元滴定法による検討の結果、いずれの抗体も酸化還元電位をマイナス側へ変化させる結果を示唆するものだった。このことは比較的平面性をよく認識する MFIG であっても、電荷的に中性の化合物を認識することは出来ず、少なくとも一つの静電的相互作用が存在し、化合物の電子密度を高めることになったことが原因であると推察される。

また、抗体の存在下 MBzV^{2+} の還元体の吸収スペクトルが得られなかったことについて、抗体による認識の結果 dithionite が MBzV^{2+} に近づくことが出来なくなったという可能性も考えられる。しかし、dithionite の活性種は $\text{SO}_2^{\cdot-}$ という小分子と考えられており (112)、比較的アポタンパク質の内側に埋め込まれたヘムなどを還元することもできるので、この可能性は低いと思われる。

抗パラコート抗体がパラコートをどのように認識しているかということに関して、ELISA 法の結合阻害実験によってある程度把握できたが、抗体のアミノ酸配列の決定、そして computer modelling による認識部位の構築を行えばより詳細が明らかになると思う。X線解析ができればなおさらよい。これらの検討は抗体に何らかの機能が見られた後に行う予定だったのでまだ行っていない。しかし、こうした検討によってパラコート類縁化合物がどのように認識されているかが明らかになれば、ハプテンの改良、機能の最適化へつながるものと考えている。

抗体の親和性について IC_{50} という相対的な値で求めた。Kd を算出することが望ましかったが、パラコートの比放射活性の低さや、蛍光強度変化の小ささなどから算出するには至らなかった。しかし、いずれの IgG もハプテンのアナログである 3,8-dimethyl-3,8-phenanthroline に対し、1-3 nM という IC_{50} 値を示したことから親和性

が高いことを示している。親和性の高さは抗体の持つ1つの特性であるが、抗体に触媒的機能を発現させる際には必ずしも有効に働くとは限らない。抗体触媒において transition-state stabilization のストラテジーで得られた加水分解活性は、基質とハプテンとの認識能の差 (K_m/K_i) が触媒活性 (k_{cat}/k_{uncat}) に反映されると考えられている (37)。ここで得られた抗パラコート抗体で、ハプテンと viologen 化合物がよく似ていることが具体的な酸化還元電位の測定に至らなかった理由かもしれない。

第5章

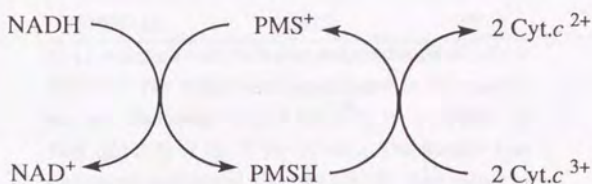
種々の化学反応にもたらす

抗パラコート抗体の効果に関する試み

第4章で得られた抗パラコート抗体は、認識能の差こそ見られたが具体的な酸化還元電位を求めるには至らなかった。その原因として viologen 化合物に対する親和性の高さが考えられた。そこでハプテンの構造を規範として認識部位に当てはめることが可能な化合物をデザインし、何かしらの触媒活性を見出すことは出来ないかと考えた。触媒活性発現には抗体の認識力、反応点となるアミノ酸残基の性質などが考えられた。そこで平面性と、静電的相互作用によって認識部位に存在するであろうアニオン性残基による求核性（塩基性）を考慮して、以下の反応系に対するモノクローナル抗体の効果を検討した。

第1節 電子伝達系に対する効果

MB1G、MB2G は redox-mediator として知られる phenazine methosulfate (PMS⁺) に対する親和性を示した。そこで NADH-PMS⁺-Cyt.c³⁺ で構築される電子伝達系モデル反応 (113,114) に対する効果を検討した (Scheme 5-1)。抗体による認識によって、反応の加速効果や特異性の変化が期待された。



Scheme 5-1. Electron Transfer Model Reaction

触媒量の PMS⁺ を含む条件で、Cyt.c³⁺ の還元速度を測定したところ、PMS⁺ は最高約 1000 回の回転数を示した。モノクローナル抗体の存在下、この電子伝達反応は抗体の PMS⁺ に対する親和性にはほぼ依存して阻害された (Table 5-1)。NADH の消費速度を測定したところ、モノクローナル抗体は NADH が PMS⁺ を還元する過程を阻害することが分かった (data not shown)。これは PMS⁺ は平面であるのに対し、NADH によって 2 電子還元されたジヒドロ体 (PMSH) は歪むことが知られているが¹¹⁵⁾、抗体による認識によって歪みが抑制されるために還元されにくくなり、この反応が阻害されたものと考えられた。

Table 5-1 mAb Effect on Cyt.c Reduction Rate

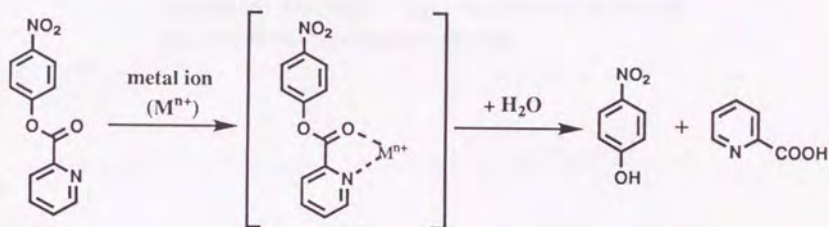
mAb (ratio)	Initial rate ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Relative rate (%)
none	0.260	100
MA1G (1) ¹⁾	0.251	97
MA1G (3) ¹⁾	0.285	110
MA1G (3)	0.217	84
MF1G (1)	0.192	74
MF1G (3)	0.0909	35
MB2G (1)	0.131	50
MB2G (3)	0.0852	33

Cyt.c reduction was measured spectrophotometrically at 550 nm. The mAbs were preincubated in the reaction mixture, containing 15 μM Cyt.c³⁺, 10 nM PMS⁺ in PBS (pH 7.4) at 25 °C for 10 min. The reaction was initiated by addition of 100 μM NADH. The values in the parentheses are the ratio of mAb binding-site concentration versus PMS⁺ concentration.

¹⁾without preincubation.

第2節 加水分解反応に対する効果

カルボン酸の *p*-nitrophenyl ester は、その生成物の測定の簡便さから、加水分解反応の基質としてよく用いられる (116)。*p*-nitrophenylpicolinate は、金属イオンの配位、及び加水分解反応の促進が見られることから、金属酵素モデルとして広く用いられている (Scheme 5-2) (117,118)。この金属イオンとの complex は、基質のみよりも平面性が高まりカチオン性を持つことから、抗体による認識効果が見られるのではないかと考えた。抗体による認識が見られれば、基質と金属イオンとの結合能の上昇による加速効果や、抗体認識部位に存在するであろう求核性 (塩基性) 残基による加水分解活性の促進などが起きると考えた。



Scheme 5-2. Hydrolysis of *p*-Nitrophenylpicolinate

p-nitrophenylpicolinate の加水分解反応は、金属イオンや抗体の添加無しにも見られ、その速度定数と活性化エネルギーなどを Table 5-2 に示した。この反応は金属イオンの添加により加速効果が見られ、その効果は $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ の順に高かった (data not shown)。しかし、抗体の添加効果及び金属イオンと抗体の添加による効果は見られなかった。

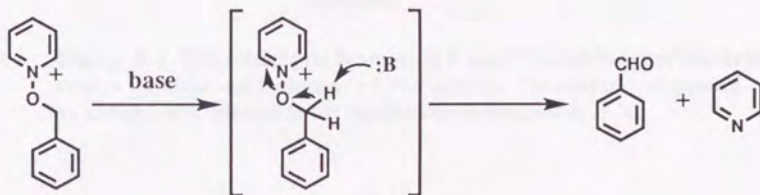
Table 5-2 The Reaction Parameter of Spontaneous Hydrolysis of *p*-Nitrophenylpicolinate

temperature (°C)	k_{obs} ($\times 10^3 \text{ h}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (h)
20	68.2	10.2
25	133.5	5.19
30	231.5	2.99
37	499.5	1.39
Ea (kcal/mol)		21.0
ΔH^\ddagger (kcal/mol)		20.4
ΔS^\ddagger (cal/mol·K)		-10.5
ΔG^\ddagger (kcal/mol)		23.5

p-Nitrophenol formation was monitored spectrophotometrically at 400 nm. The reaction was initiated by adding substrate to PBS (pH 7.4) thermostated at the indicated temperature. The values of k_{obs} were calculated from initial rates of different substrate concentrations.

第3節 benzaldehyde 生成反応に対する効果

N-oxide 化合物を用いた、haloalkane からの一段階 aldehyde 生成反応は、その中間体として alkoxyammonium cation を取り、さらに proton の引き抜きに base を要する反応である (119-122)。そこで pyridine N-oxide と benzylbromide から N-benzyloxy pyridinium を合成し、これを基質として benzaldehyde 生成を検討した (Scheme 5-3)。抗体による認識が見られれば、中性条件下でも抗体認識部位に存在するであろう求核性 (塩基性) 残基が proton の引き抜きを触媒し、反応の加速が見られるのではないかと考えた。



Scheme 5-3. Benzaldehyde Formation from N-Benzyloxy pyridinium

1N NaOH 水溶液中では、50 min で約 25% の収率で benzaldehyde 生成が見られた (Fig. 5-1)。pH 7.4 の PBS 中では 8 時間後でも、抗体のあるなしにかかわらず、benzaldehyde 生成は全く見られなかった。

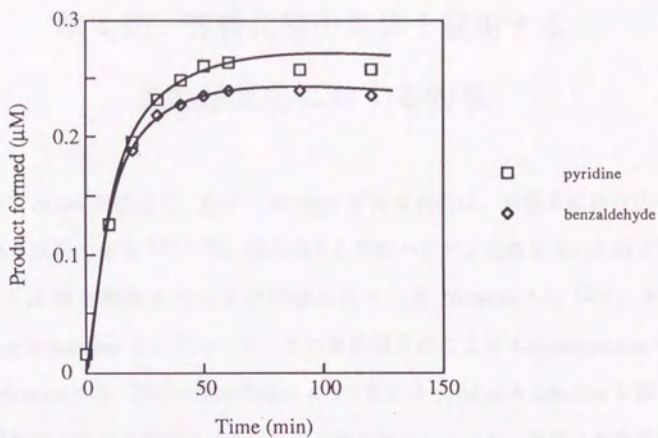


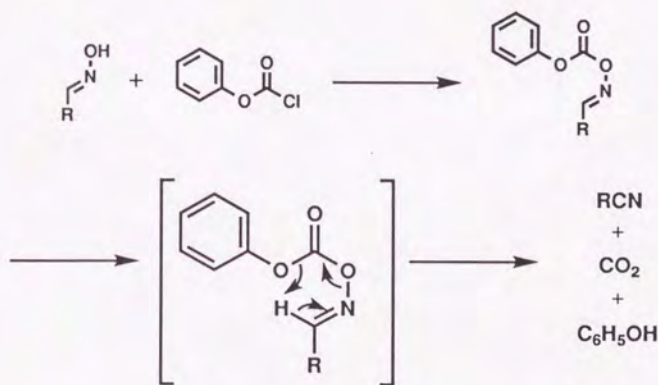
Figure 5-1. Benzaldehyde formation from N-benzyloxypyridinium.
 Product formation was measured by HPLC analysis. The reaction was initiated by adding 1 mM substrate to 1 N NaOH(aq), thermostatzed at 25 °C.

第4節 芳香化型中間体を經由する

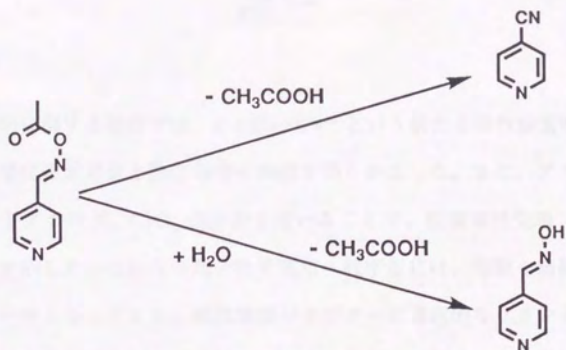
脱酢酸反応に対する効果

aldehyde から oxime を經由し、脱水させ nitrile を得る反応は、官能基変換反応の一つとして知られる反応である (123-126)。脱水剤として酸ハロゲン化物を用いた例では、中間体として 6 員環を經由することが示唆されている (Scheme 5-4) (123)。そこで O-acetylpyridine-4-aldoxime を基質として、その脱酢酸反応による 4-cyanopyridine の生成を検討した (Scheme 5-5)。同時に加水分解によって生じる pyridine-4-aldoxime も検出を試みた。この脱酢酸反応の中間体はバラコート骨格に類似しており、抗体は芳香化型の中間体を認識し安定化させることで反応を加速するのではないかと考えた。

しかし pH 7.4 の PBS 中 6 時間後でも、抗体のあるなしにかかわらず、product の生成は見られなかった。



Scheme 5-4. Proposed Mechanism of Nitrile Formation
(according to ref. 123)



Scheme 5-5. Degradation of O-Acetylpyridine-4-aldoxime

総括

活性酸素増産剤に関する検討では、4'-NO₂ MPP⁺ という新たな活性酸素増産剤を見出し、化合物の酸化還元電位と酸素毒性の相関を明らかにした。また、アルキル鎖長の異なるパラコートアナログ、C₁C_n 化合物を用いることで、酸素毒性発現における細胞内挙動の重要性を示した。これらの化合物を実用へ転ずるには、細胞や組織に対する選択性が重要なテーマとなってくる。細胞表面レセプターに選択的なリガンドなどと結合させることで、抗がん活性なども引き出すことができるのではないかと考えられる。また、酸素ストレスの解明は疾患や老化などを考えるうえで重要であり、これらの活性酸素増産剤はそのツールとなりうるだろう。

抗パラコート抗体に関する検討は、決して十分な結果が得られたとは思わないが、抗体による認識、リガンドとの相互作用に基づく新たな活性発現は、今だもって無限の可能性を秘めており、さらなる発展が期待できる。新たなアプローチを考えてみたくなるテーマである。

Materials and Methods

General Method for Organic Synthesis

Unless otherwise noted, materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Ether and benzene were dried by distilling from CaH₂. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium with benzophenone as an indicator. MeOH, EtOH, AcOEt, CH₂Cl₂, CHCl₃ and n-hexane were purified by distillation. Dimethylformamide (DMF) and pyridine were dried with Linde type 4A molecular sieves. All aqueous solutions were prepared from distilled water or milli Q water. Silica gel chromatography was performed using Kiesel gel 60 (230-400 mesh; Merck) silica gel. Melting points were determined using a Yanaco melting point apparatus and are uncorrected.

Synthesis of MPP⁺ Derivatives 1-10

1). Precursors of MPP⁺ derivatives.

4-(4'-Nitrophenyl)pyridine and 4-(3'-nitrophenyl)pyridine were prepared by nitration of 4-phenylpyridine according to the method of Forsyth and Pyman [127]. Crude 4-(4'-nitrophenyl)pyridine was recrystallized from n-hexane to give colorless needles. The yield was 29%. mp 118-121 °C [lit. 123-124 °C [127]]. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 7.54 (d-d, 2H, H₃, *J* = 4.4, 1.5 Hz), 7.80 (d, 2H, H₂', *J* = 8.8 Hz), 8.36 (d, 2H, H₃', *J* = 8.8 Hz), 8.76 (d, 2H, H₂, *J* = 4.4 Hz). MS *m/z*: 200 (M⁺), 154 (M⁺-NO₂). IR (KBr): 1350, 1510 cm⁻¹ (NO₂). Crude 4-(3'-nitrophenyl)pyridine was recrystallized from n-hexane to give pale yellow needles. The yield was 12%. mp 108.5-109 °C [lit. 109-110 °C [127]]. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 7.57 (d-d, 2H, H₂, *J* = 4.4, 1.5 Hz), 7.70 (d-d, 1H, H₅', *J* = 8.1, 8 Hz), 7.98 (d, 1H, H₆', *J* = 8 Hz), 8.32 (d, 1H, H₄', *J* = 8.1 Hz), 8.52 (d, 1H, H₂', *J* = 2.2 Hz), 8.75 (d-d, 2H, H₂, *J* = 4.4, 1.5 Hz). MS *m/z*: 200 (M⁺), 154 (M⁺-NO₂). IR (KBr): 1360, 1500 cm⁻¹ (NO₂).

4-(4'-Aminophenyl)pyridine was prepared by reduction of 4-(4'-nitrophenyl)pyridine. 4-(4'-Nitrophenyl)pyridine (1.0 g; 5.0 mmol) dissolved in c. HCl (27 ml) was poured onto Fe powder (1.5 g; 26 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for at least 30 min, made basic, and extracted with ether. After removal of ether, the crude product obtained was recrystallized from EtOH to give 4-(4'-aminophenyl)pyridine as pale brown flakes. The yield was 560 mg (61%). mp 231.5-234.5 °C [lit. 232-234 °C ¹²⁷]. Tended to sublime. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/d₆-DMSO/TMS) δ: 3.48 (br, 1H, -NH₂), 5.30 (br, 1H, -NH₂), 6.69 (d, 2H, H_{3'}, *J* = 8.8 Hz), 7.48 (d, 2H, H_{2'}, *J* = 8.8 Hz), 7.50 (d, 2H, H₃, *J* = 6 Hz), 8.48 (d, 2H, H₂, *J* = 6 Hz). MS *m/z*: 170 (M⁺).

4-(3'-Aminophenyl)pyridine was prepared by reduction of 4-(3'-nitrophenyl)pyridine. 4-(3'-Nitrophenyl)pyridine (1.0 g; 5.0 mmol) dissolved in 6N HCl (20 ml) was poured onto Fe powder (1.0 g; 17 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min, made basic, and extracted with ether. After removal of ether, the crude product obtained was recrystallized from 2-propanol to give 4-(3'-aminophenyl)pyridine as colorless needles. The yield was 657 mg (77%). mp 167.0-167.5 °C. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/d₆-DMSO/TMS) δ: 4.5 (br, 2H, -NH₂), 6.6-7.3 (m, 4H, aromatic protons), 7.5 (d, 2H, H₃, *J* = 6.1 Hz), 8.6 (d, 2H, H₂, *J* = 6.1 Hz). MS *m/z*: 170 (M⁺).

4-(4'-Cyanophenyl)pyridine was prepared by cyanization via diazotization of 4-(4'-aminophenyl)pyridine. Before diazotization, CuCN solution was prepared as follows. A solution of NaHSO₃ (125 mg; 1.2 mmol) and NaOH (100 mg; 2.5 mmol) in water (10 ml) was added to a mixture of CuSO₄·5H₂O (780 mg; 3.1 mmol) and KCl (230 mg; 3.1 mmol) in 30 ml hot water (60 °C), giving a pale green precipitate of CuCl. After it had cooled, the supernatant was removed by decantation. To this CuCl solution, KCN (585 mg; 9.0 mmol) in water (10 ml) was added and a clear solution of CuCN (ca. 35 ml) was obtained. Separately, NaNO₂ (38 mg; 0.50 mmol) in water (1 ml) was added to 4-(4'-aminophenyl)pyridine (85 mg; 0.50 mmol) in 2N HCl (5 ml), keeping the temperature below 0 °C. The reaction mixture was adjusted to 8 at pH with sat. NaHCO₃, then the

CuCN solution (20 ml; ca. 1.7 mmol as CuCN) prepared above was added. The brown precipitate that appeared was extracted with ether. After removal of ether, the crude product was recrystallized from *n*-hexane to obtain orange needles. The yield was 34 mg (38%). mp 80-83 °C. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 7.5 (d, 2H, H₃, *J* = 6 Hz), 7.7 (m, 4H, aromatic protons), 8.7 (d, 2H, H₂, *J* = 6 Hz). MS *m/z*: 180 (M⁺). IR (KBr): 2200 cm⁻¹ (CN).

4-(4'-Chlorophenyl)pyridine was prepared by chlorination via diazotization of 4-(4'-aminophenyl)pyridine. A solution of 4-(4'-aminophenyl)pyridine (170 mg; 1.0 mmol) in *c.* HCl (4.5ml) was treated with NaNO₂ (79 mg; 1.0 mmol) keeping the temperature below 0 °C. Stirring was continued for 15 min, then FeCl₃·6H₂O (270 mg; 1.0 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 45 min, made basic and extracted with ether. The solvent was completely evaporated to leave a yellow solid. This crude 4-(4'-chlorophenyl)pyridine was converted to the quaternary salt without further purification.

4-(4'-Acetamidophenyl)pyridine was prepared from 4-(4'-aminophenyl)pyridine. 4-(4'-Aminophenyl)pyridine (60 mg; 0.35 mmol) was dissolved in (CH₃CO)₂O (1.0 ml) and stirred at room temperature for 5 min. Water (1 ml) was added in order to convert excess (CH₃CO)₂O to acetic acid. The mixture was made basic and extracted with ether. Evaporation of the extract provided a crude product, which was recrystallized from H₂O, to give 4-(4'-acetamidophenyl)pyridine as colorless needles. The yield was 50 mg (67%). mp 216-218 °C. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/d₆-DMSO/TMS) δ: 2.1 (s, 3H, CH₃CO), 7.6 (m, 6H, aromatic protons), 8.6 (m, 2H, H₂), 10.0 (br, 1H, -NHCO-). MS *m/z*: 212 (M⁺). IR (KBr): 1660 cm⁻¹ (C=O).

4-(4'-Dimethylaminophenyl)pyridine was prepared from 4-(4'-aminophenyl)pyridine. NaB(CN)H₃ (600 mg; 9.5 mmol) was added to 4-(4'-Aminophenyl)pyridine (850 mg; 5.0 mmol) and 6 ml of 37% HCHO in 40 ml CH₃CN. Acetic acid (1 ml) was dropwise added to this mixture. Then the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hr, made basic, and extracted with ether. After removal of ether, the crude product obtained was

recrystallized from MeOH to give a fluorescent substance as light yellow needles. The yield was 389 mg. mp 167-171 °C. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/d₆-DMSO/TMS) δ: 3.1 (s, 6H, -CH₃), 6.8 (d, 2H, H₃', J=9Hz), 7.7 (d, 2H, H₂', J =9 Hz), 7.8 (d, 2H, H₃, J =7 Hz), 8.4 (d, 2H, H₂, J =7 Hz). IR data suggested that this substance was base-borane complex, because the complex typically shows the peak at 2400 cm⁻¹. So this substance (297 mg) was dissolved in c.HCl (80 ml) and refluxed for 3 days. The reaction mixture was made basic and extracted with ether. After removal of ether, the crude product obtained was recrystallized from MeOH to give 4-(4'-dimethylaminophenyl)pyridine as pale yellow flakes. The yield was 125 mg. mp 236.0-237.5 °C. Tended to sublime. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 3.0 (s, 6H, -CH₃), 6.7 (d, 2H, H₃', J=9Hz), 7.4 (d, 2H, H₃, J =6 Hz), 7.5 (d, 2H, H₂', J =9 Hz), 8.5 (d, 2H, H₂, J =6 Hz). MS m/z: 198 (M⁺). IR (KBr): The peak at 2400 cm⁻¹ disappeared.

4-(3'-Dimethylaminophenyl)pyridine was prepared from 4-(3'-aminophenyl)pyridine. NaB(CN)H₃ (950 mg; 15 mmol) was added to 4-(3'-aminophenyl)pyridine (850 mg; 5.0 mmol) and 4 ml of 37% HCHO in 40 ml CH₃CN. Acetic acid (1 ml) was dropwise added to this mixture. Then the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hr, made basic, and extracted with ether. After removal of ether, the crude product obtained was recrystallized from MeOH to give a fluorescent substance as light yellow powder. The yield was 818 mg. mp 103-109 °C. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 3.0 (s, 6H, -CH₃), 6.8-7.5 (m, 4H, aromatic protons), 7.8 (d, 2H, H₃, J =7 Hz), 8.6 (d, 2H, H₂, J =7 Hz). IR data suggested that this substance was base-borane complex, too. So this substance (621 mg) was dissolved in c.HCl (8 ml) and refluxed for 13 hr. The reaction mixture was made basic and extracted with ether. The solvent was completely evaporated to leave a pale yellow solid. This crude 4-(3'-dimethylaminophenyl)pyridine was converted to the quaternary salt without further purification.

2). MPP⁺ derivatives.

MPP⁺ derivatives (1-10) were also prepared by N-methylation of 4-phenylpyridine and the corresponding precursors obtained according to the above methods. Precursors of MPP⁺ derivatives were dissolved in methyl iodide, if necessary, dimethylformamide was added to dissolve. The reaction mixtures were kept at room temperature overnight to convert them to the corresponding quaternary salts. After evaporation, each product was purified by recrystallization.

1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺, 5) was recrystallized from 2-propanol as pale yellow needles. mp 174-176 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 4.68 (s, 3H, N-CH₃), 7.58 (m, 3H, H₃, H₄'), 7.80 (d-d, 2H, H₂', J = 8.1, 1.5 Hz), 8.24 (d, 2H, H₃, J = 7 Hz), 9.32 (d, 2H, H₂, J = 7 Hz). MS m/z: 297 (M⁺). IR (KBr): 3000 cm⁻¹ (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₂H₁₂N₁I: N,4.71; C,48.50; H,4.07. Found: N,4.51; C,48.50; H,4.06.

1-Methyl-4-(4'-nitrophenyl)pyridinium iodide (1) was recrystallized from MeOH as a yellow powder. The yield was 133 mg (78%). mp 227-228 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.38 (s, 3H, N-CH₃), 8.32 (d, 2H, H₂', J = 9 Hz), 8.45 (d, 2H, H₃', J = 9 Hz), 8.61 (d, 2H, H₃, J = 7.0 Hz), 9.13 (d, 2H, H₂, J = 7.0 Hz). IR (KBr): 1350, 1520 cm⁻¹ (NO₂), 3000 cm⁻¹ (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₂H₁₁N₂O₂I: N,8.19; C,42.12; H,3.24; Found: N,7.88; C,41.99; H,3.26.

1-Methyl-4-(3'-nitrophenyl)pyridinium iodide (3) was recrystallized from MeOH as yellow cubes. The yield was 118 mg (69%). mp 287 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.37 (s, 3H, N-CH₃), 7.94 (t, 1H, H₅', J = 8.1 Hz), 8.48 (d-q, 2H, H₄', H-6', J = 8.1, 2 Hz), 8.65 (d, 2H, H₃, J = 6.6 Hz), 8.83 (t, 1H, H₂', J = 2 Hz), 9.10 (d, 2H, H₂, J = 6.6 Hz). IR (KBr): 1350, 1510 cm⁻¹ (NO₂) 3000 cm⁻¹ (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₂H₁₁N₂O₂I: N,8.19; C,42.12; H,3.24. Found: N,7.91; C,42.18; H,3.20.

1-Methyl-4-(4'-aminophenyl)pyridinium iodide (10) was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 139 mg (76%). mp 272-275 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/d₆-DMSO/TMS) δ: 4.21 (s, 3H, N-CH₃), 6.23 (br, 2H, -NH₂), 6.73 (d,

2H, H_{3'}, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (d, 2H, H_{2'}, *J* = 8.8 Hz), 8.19 (d, 2H, H₃, *J* = 7.3 Hz), 8.70 (d, 2H, H₂, *J* = 7.3 Hz). IR (KBr): 3000 cm⁻¹ (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₂H₁₃N₂I: N,8.97; C,46.17; H,4.20. Found: N,8.81; C,46.31; H,4.20.

1-Methyl-4-(3'-aminophenyl)pyridinium iodide (**9**) was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 485 mg (64%). mp 225 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.22 (s, 3H, N-CH₃), 6.83 (d, 1H, H_{4'}, *J* = 8 Hz), 7.10 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.26 (t, 1H, H_{5'}, *J* = 8 Hz), 8.16 (d, 2H, H₃, *J* = 5.5 Hz), 8.66 (s, 2H, H₂). IR (KBr): 3020 cm⁻¹ (N-CH₃), 3190 3280 3350 cm⁻¹ (NH₂).

1-Methyl-4-(4'-cyanophenyl)pyridinium iodide (**2**) was recrystallized from EtOH as brown flakes. The yield was 16 mg (27%). mp 149 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.35 (s, 3H, N-CH₃), 8.13 (d, 2H, H_{2'}, *J* = 8.1 Hz), 8.24 (d, 2H, H_{3'}, *J* = 8.1 Hz), 8.57 (d, 2H, H₃, *J* = 7 Hz), 9.08 (d, 2H, H₂, *J* = 7 Hz). IR (KBr): 2220 cm⁻¹ (CN), 3000 cm⁻¹ (N-CH₃).

1-Methyl-4-(4'-chlorophenyl)pyridinium iodide (**4**) was recrystallized from MeOH as yellow flakes. The yield was 60 mg (44%). mp 257 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.32 (s, 3H, N-CH₃), 7.73 (d, 2H, H_{3'}, *J* = 8.8 Hz), 8.10 (d, 2H, H_{2'}, *J* = 8.8 Hz), 8.50 (d, 2H, H₃, *J* = 7.0 Hz), 9.02 (d, 2H, H₂, *J* = 7.0 Hz). IR (KBr): 3000 cm⁻¹ (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₂H₁₁NCII: N,4.22; C,43.46; H,3.34. Found: N,4.18; C,43.38; H,3.32.

1-Methyl-4-(4'-acetamidophenyl)pyridinium iodide (**8**) was recrystallized from MeOH as pale yellow needles. The yield was 68 mg (56%). mp >300 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 2.10 (s, 3H, -COCH₃), 4.27 (s, 3H, N-CH₃), 7.81 (d, 2H, H_{3'}, *J* = 9 Hz), 8.07 (d, 2H, H_{2'}, *J* = 9 Hz), 8.42 (d, 2H, H₃, *J* = 7.0 Hz), 8.92 (d, 2H, H₂, *J* = 7.0 Hz), 10.35 (s, 1H, -NHCO-). IR (KBr): 1680 cm⁻¹ (CONH). Anal. Calcd for C₁₄H₁₅N₂OI: N,7.91; C,47.47; H,4.27. Found: N,7.65; C,47.47; H,4.30.

1-Methyl-4-(4'-trimethylammonio)pyridinium diiodide (**6**) was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 168 mg (31%). mp 173 °C (dec.). ¹H-

NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 3.68 (s, 9H, -CH₃), 4.34 (s, 3H, N-CH₃), 8.23 (d, 2H, H_{2'} or H_{3'}, J = 9.2 Hz), 8.34 (d, 2H, H_{2'} or H_{3'}, J = 9.2 Hz), 8.61 (d, 2H, H₃, J = 6.6 Hz), 9.13 (d, 2H, H₂, J = 6.6 Hz). IR (KBr): 3000 cm^{-1} (N-CH₃).

1-Methyl-4-(3'-trimethylammoniophenyl)pyridinium diiodide (**7**) was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 992 mg (80%). mp 243 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 3.70 (s, 9H, -CH₃), 4.37 (s, 3H, N-CH₃), 7.90 (t, 1H, H_{5'}, J = 8 Hz), 8.21-8.27 (m, 2H, H_{4'}, H_{6'}), 8.53 (s, 1H, H_{2'}, J = 7.0 Hz), 8.64 (d, 2H, H₃, J = 7 Hz), 9.14 (d, 2H, H₂, J = 7 Hz). IR (KBr): 3000 cm^{-1} (N-CH₃).

Synthesis of Monoquat (**11**) and Paraquat (PQ^{2+} , C_1C_1)

Monoquat (**11**) was prepared by N-monomethylation of 4,4'-dipyridyl with methyl iodide. Methyl iodide (7.1 g; 50 mmol) was added to 4,4'-dipyridyl (1.56 g; 10 mmol) in CHCl₃ (50 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hr. Yellow precipitate was filtered. The crude product obtained was recrystallized from EtOH to give 1-methyl-4-(4'-pyridyl)pyridinium (monoquat, **11**) as yellow needles. The yield was 1.86 g (63%). mp 241 °C (dec.). ¹H-NMR (60 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.4 (s, 3H, N-CH₃), 8.0 (d-d, 2H, H_{3'}, J = 6 Hz, 1 Hz), 8.6 (d, 2H, H₃, J = 7 Hz), 8.8 (d-d, 2H, H_{2'}, J = 6 Hz, 1 Hz), 9.1 (d, 2H, H₂, J = 7 Hz). IR (KBr): 3000 cm^{-1} (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₁H₁₁N₂I: N,9.40; C,44.29; H,3.67. Found: N,9.21; C,44.35; H,3.69.

Paraquat (PQ^{2+} , C_1C_1) were prepared by N-methylation of 4,4'-dipyridyl with methyl iodide. 1,1'-Dimethyl-4,4'-dipyridinium diiodide (paraquat, PQ^{2+} , C_1C_1) was recrystallized from H₂O/MeOH as red needles. mp >300 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.43 (s, 6H, N-CH₃), 8.76 (d, 4H, H₃, J = 7 Hz), 9.28 (d, 4H, H₂, J = 7 Hz). IR (KBr): 3000 cm^{-1} (N-CH₃). Anal. Calcd for C₁₂H₁₄N₂I₂: N,6.37; C,32.75; H,3.21. Found: N,6.52; C,33.01; H,3.16.

Synthesis of C_1C_n compounds

C_1C_n compounds ($n=2-8$) were also prepared by N-alkylation of monoquat. Corresponding alkyl iodide (5 eq.) was added to monoquat in dimethylformamide. The reaction mixtures were stirred at room temperature for 20 hr, or at 70-80 °C for a few hours to convert them to the corresponding dication compounds. Each crude product that appeared was filtered and purified by recrystallization.

1-Methyl-1'-ethyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C_1C_2) was recrystallized from MeOH as red needles. The yield was 1.51 g (33%). mp 260-262 °C (dec.). 1H -NMR (60 MHz; d_6 -DMSO) δ : 1.6 (t, 3H, $-CH_2CH_3$, $J=7$ Hz), 4.4 (s, 3H, N-CH₃), 4.7 (q, 2H, N-CH₂-, $J=7$ Hz), 8.7 (d, 4H, H₃, H_{3'}, $J=7$ Hz), 9.2 (d, 2H, H_{2'}, $J=7$ Hz), 9.4 (d, 2H, H₂, $J=7$ Hz). Anal. Calcd for $C_{13}H_{16}N_2I_2$: N,6.17; C,34.36; H,3.52. Found: N,5.93; C,34.43; H,3.54.

1-Methyl-1'-propyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C_1C_3) was recrystallized from MeOH as red flakes. The yield was 2.25 g (50%). mp 245-250 °C (dec.). 1H -NMR (60 MHz; d_6 -DMSO) δ : 0.7-1.1 (m, 3H, $-CH_2CH_3$, $J=7$ Hz), 1.7-2.3 (m, 2H, $-CH_2CH_3$), 4.2-5.0 (m, 5H, N-CH₃, N-CH₂-), 8.6-9.0 (m, 4H, H₃, H_{3'}), 9.2-9.6 (m, 4H, H₂, H_{2'}). Anal. Calcd for $C_{14}H_{18}N_2I_2$: N,5.98; C,35.90; H,3.85. Found: N,6.02; C,36.07; H,3.81.

1-Methyl-1'-butyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C_1C_4) was recrystallized from MeOH as red flakes. The yield was 2.56 g (53%). mp 251-254 °C (dec.). 1H -NMR (60 MHz; d_6 -DMSO) δ : 0.6-1.6 (m, 5H, $-CH_2CH_3$, $J=7$ Hz), 1.6-2.3 (m, 2H, $-CH_2CH_2CH_3$), 3.7-5.2 (m, 5H, N-CH₃, N-CH₂-), 8.4-9.0 (m, 4H, H₃, H_{3'}), 9.0-9.8 (m, 4H, H₂, H_{2'}). Anal. Calcd for $C_{15}H_{20}N_2I_2$: N,5.81; C,37.34; H,4.14. Found: N,5.87; C,37.54; H,4.08.

1-Methyl-1'-pentyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C_1C_5) was recrystallized from MeOH as red flakes. The yield was 2.46 g (50%). mp 245-247 °C (dec.). 1H -NMR (60 MHz; d_6 -DMSO) δ : 0.6-1.1 (m, 3H, $-CH_2CH_3$), 1.1-1.6 (m, 4H, $-CH_2CH_2CH_3$), 1.6-2.3 (m, 2H, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3.9-5.0 (m, 5H, N-CH₃, N-CH₂-), 8.4-9.0 (m, 4H, H₃,

H₃'), 9.0-9.5 (m, 4H, H₂, H₂'). Anal. Calcd for C₁₆H₂₂N₂I₂: N,5.65; C,38.71; H,4.44. Found: N,5.69; C,38.84; H,4.38.

1-Methyl-1'-hexyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C₁C₆) was recrystallized from MeOH-EtOH as red flakes. The yield was 1.22 g (24%). mp 240-242 °C (dec.). ¹H-NMR (60 MHz; d₆-DMSO) δ: 0.6-1.0 (m, 3H, -CH₂CH₃), 1.0-1.6 (m, 6H, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.6-2.2 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 4.0-5.0 (m, 5H, N-CH₃, N-CH₂-), 8.4-9.0 (m, 4H, H₃, H₃'), 9.0-9.5 (m, 4H, H₂, H₂'). Anal. Calcd for C₁₇H₂₄N₂I₂: N,5.49; C,40.00; H,4.71. Found: N,5.47; C,40.06; H,4.64.

1-Methyl-1'-heptyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C₁C₇) was recrystallized from MeOH as red flakes. The yield was 2.63 g (50%). mp 244-247 °C (dec.). ¹H-NMR (60 MHz; d₆-DMSO) δ: 0.6-1.1 (m, 3H, -CH₂CH₃), 1.1-1.7 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.7-2.3 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 4.0-5.2 (m, 5H, N-CH₃, N-CH₂-), 8.5-9.1 (m, 4H, H₃, H₃'), 9.1-9.9 (m, 4H, H₂, H₂'). Anal. Calcd for C₁₈H₂₆N₂I₂: N,5.34; C,41.22; H,4.96. Found: N,5.39; C,41.32; H,4.87.

1-Methyl-1'-octyl-4,4'-dipyridinium diiodide (C₁C₈) was recrystallized from MeOH as red flakes. The yield was 2.37 g (44%). mp 247-249 °C (dec.). ¹H-NMR (60 MHz; d₆-DMSO) δ: 0.6-1.0 (m, 3H, -CH₂CH₃), 1.0-1.6 (m, 10H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.6-2.3 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 4.0-5.1 (m, 5H, N-CH₃, N-CH₂-), 8.4-9.1 (m, 4H, H₃, H₃'), 9.1-9.7 (m, 4H, H₂, H₂'). Anal. Calcd for C₁₉H₂₈N₂I₂: N,5.20; C,42.38; H,5.20. Found: N,5.00; C,42.54; H,5.21.

1-Methyl-1'-nonyl-4,4'-dipyridinium dibromide (C₁C₉) and 1-methyl-1'-decyl-4,4'-dipyridinium dibromide (C₁C₁₀) were presented from Dr. Fujioka ⁹⁷).

Synthesis of Hapten for Immunization

3-Picolyl chloride (4.92 g, 30 mmol) and triphenylphosphine (1.0 eq) in DMF (150 ml) were refluxed at 160 °C under argon for 5.5 hr. Pink colored precipitates were filtered and dried *in vacuo*. 3-Pyridylmethyltriphenylphosphonium chloride hydrochloride was

obtained as pale pink powder (c.y. 88%). $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz; $d_6\text{-DMSO}$) δ : 4.9-5.2(m, 2H, $-\text{CH}_2-$) 7.2(d, 1H, H_5 , $J=5$ Hz) 7.4-8.0(m, 16H, aromatic protons) 8.1(s, 1H, H_2) 8.3-8.4 (m, 1H, H_6).

To 3-pyridylmethyltriphenylphosphonium chloride hydrochloride (4.26 g, 10 mmol) in anhydrous THF (160 ml), $t\text{BuOK}$ (1.0 eq) in anhydrous THF (38 ml) was added and stirred at room temperature under argon for 30 min. Then 3-pyridine carboxaldehyde (1.0 eq) in anhydrous THF was added dropwise and stirred at r.t. under argon for 2.5 hr. To the reaction mixture 2N NaOH was added and organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 . After removal of organic solvent, the residue was purified with silica gel column chromatography (eluent; CH_2Cl_2 and AcOEt), and stilbazole (*cis-trans* mixture) were obtained as pale brown oil. The yield was 86%. MS 182(M^+).

Stilbazole (1.57 g, 8.6 mmol) in benzene (1.3 l) was irradiated with high-pressure Hg lump (400 W), stirring at room temperature under argon for 20 hr in the presence of I_2 (8 mg) as photo-initiator. After removal of solvent, the residue was purified with silica gel column chromatography (eluent; CH_2Cl_2). 3,8-Phenanthroline was recrystallized from *n*-hexane as colorless needles. The yield was 16%. mp 147.0-148.5 $^\circ\text{C}$ [lit. 139-141 $^\circ\text{C}$ 128)]. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ : 7.97(s, 2H, H_5 , H_6) 8.44(d, 2H, H_1 , H_{10} , $J=6$ Hz) 8.87(d, 2H, H_2 , H_9 , $J=6$ Hz) 9.36(s, 2H, H_4 , H_7). MS 180(M^+). 1,8-Phenanthroline was recrystallized from *n*-hexane as colorless needles. The yield was 40%. mp 112.0-113.0 $^\circ\text{C}$ [lit. 100-104 $^\circ\text{C}$ 128)]. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ : 7.66(d-d, 1H, H_3 , $J=8.1$, 4.4 Hz) 7.83(d, 1H, H_5 , $J=8.8$ Hz) 7.92(d, 1H, H_6 , $J=8.8$ Hz) 8.26(d-d, 1H, H_4 , $J=8.1$, 1.8 Hz) 8.87(d, 1H, H_{10} , $J=6$ Hz) 9.01(d, 1H, H_9 , $J=6$ Hz) 9.07(d-d, 1H, H_2 , $J=4.4$, 1.8 Hz) 9.32(s, 1H, H_7). MS 180(M^+).

6-Bromohexanoic acid (3.9 g, 20 mmol) in acetone (40 ml) was stirred with NaI (2.0 eq) at room temperature for 33 hr. Colorless precipitate (NaBr) was filtered off. After removal of acetone, the residue was recrystallized from *n*-hexane to give 6-iodohexanoic

acid as pale yellow needles. The yield was 81%. mp 43.0-43.5 °C [lit. 43-43.5 °C 129)]. ¹H-NMR (60 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 1.4-2.0(m, 6H, H₃, H₄, H₅) 2.4(t, 2H, H₂, *J* = 6 Hz) 3.2(t, 2H, H₆, *J* = 6 Hz) 9.7(br, 1H, -COOH). MS 242(M⁺), 225(M⁺-OH), 197(M⁺-COOH). IR 1700 cm⁻¹(C=O).

To 6-iodohexanoic acid (2.42 g, 10 mmol) and N-hydroxysuccinimide (1.0 eq) in CH₂Cl₂ (60 ml), DCC (1.0 eq) in CH₂Cl₂ (30 ml) was added dropwise below 5 °C. The reaction mixture was stirred below 5 °C for 50 min and then at room temperature for 24 hr. Colorless precipitate (DCU) was filtered off. After removal of organic solvent, the residue was purified with silica gel column chromatography (eluent; CH₂Cl₂) and recrystallized from n-hexane. 6-Iodo-hexanoic acid N-succinimide ester was obtained as colorless needles. The yield was 41%. mp 76.0-77.0 °C. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 1.53(m, 2H, H₄) 1.78(m, 2H, H₃) 1.87(m, 2H, H₅) 2.63(t, 2H, H₂, *J* = 7.0 Hz) 2.84(s, 4H, H_{SUC}) 3.20(t, 2H, H₆, *J* = 7.3 Hz). MS 339(M⁺), 225(M⁺-O-suc). IR 1740, 1780, 1810 cm⁻¹(C=O).

3,8-Phenanthroline (175 mg, 0.97 mmol) and 6-iodohexanoic acid N-succinimide ester (3.0 eq) in CHCl₃ (5 ml) were stirred at room temperature for 7 days. Yellow precipitate was filtered. 3-(5'-N-Succinimidylloxycarbonyl)pentyl-3,8-phenanthroline iodide was obtained. The crude yield was 60%. mp 128 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 1.44(m, 2H, H_{3'}) 1.6-1.8(m, 4H, H_{2'}, H_{4'}) 2.67(m, 2H, H_{5'}) 2.75(s, 4H, H_{SUC}) 4.81(m, 2H, H_{1'}) 8.34(d, 1H, H₆, *J* = 9 Hz) 8.50(d, 1H, H₅, *J* = 9 Hz) 9.02(d, 1H, H₁₀, *J* = 6 Hz) 9.06(d, 1H, H₉, *J* = 6 Hz) 9.23(d, 1H, H₁, *J* = 7 Hz) 9.57(d, 1H, H₂, *J* = 7 Hz) 9.65(s, 1H, H₇) 10.13(s, 1H, H₄). IR 1730, 1780, 1810 cm⁻¹(C=O).

To 3-(5'-N-succinimidylloxycarbonyl)pentyl-3,8-phenanthroline iodide (257 mg, 0.5 mmol) in DMF (5 ml), methyl iodide (10 ml) was added and stirred at room temperature for 29 hr. Red precipitate was filtered and recrystallized from MeOH/ether. 3-Methyl-8-(5'-N-succinimidylloxycarbonyl)pentyl-3,8-phenanthroline diiodide (Hapten) was obtained as orange colored needles. The yield was 49%. mp 197 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz;

d_6 -DMSO δ : 1.47(t, 2H, H₃', J = 7.5 Hz) 1.72(t, 2H, H₄', J = 7.5 Hz) 2.14(t, 2H, H₂', J = 7.5 Hz) 2.72(t, 2H, H₅', J = 7.5 Hz) 2.77(s, 4H, H_{SUC}) 4.62(s, 3H, N-CH₃) 4.87(t, 2H, H₁', J = 7.5 Hz) 8.64(s, 2H, H₅, H₆) 9.32(d, 1H, H₁, J = 7.0 Hz) 9.42(d, 1H, H₁₀, J = 7.0 Hz) 9.69(m, 2H, H₂, H₉) 10.24(s, 1H, H₄) 10.33(s, 1H, H₇). IR 1730, 1780, 1810 cm^{-1} (C=O). Anal. Calcd for C₂₃H₂₅N₃O₄I₂ (M.w. 661.29): N,6.35; C,41.77; H,3.81. Found: N,6.05; C,41.48; H,3.80.

Synthesis of Hapten Analogues and Paraquat Analogues

Hapten analogues and paraquat analogues were synthesized by N-methylation of each precursors. Usually each precursors dissolved in methyl iodide and reacted with methyl iodide at room temperature within 1 day. If necessary, polar solvent (MeOH, DMF) was added to reaction mixture, and heated or refluxed.

3-Methyl-3,8-phenanthrolium iodide was recrystallized from MeOH as yellow fine needles. The yield was 42%. mp 170 °C (dec.). ¹H-NMR (400MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.56(s, 3H, N-CH₃) 8.35(d, 1H, H₆, J = 9 Hz) 8.50(d, 1H, H₅, J = 9 Hz) 8.98(d, 1H, H₁₀, J = 6 Hz) 9.05(d, 1H, H₉, J = 6 Hz) 9.13(d, 1H, H₁, J = 7.0 Hz) 9.52(d, 1H, H₂, J = 7.0 Hz) 9.64(s, 1H, H₇) 10.04(s, 1H, H₄).

3,8-Dimethyl-3,8-phenanthrolium diiodide was recrystallized from MeOH/H₂O as red needles. The yield was 49%. mp 238 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.62(s, 6H, N-CH₃) 8.64(s, 2H, H₅, H₆) 9.32(d, 2H, H₁, H₁₀, J = 7.0 Hz) 9.66(d, 2H, H₂, H₉, J = 7.0 Hz) 10.24(s, 2H, H₄, H₇).

8-Methyl-1,8-phenanthrolium iodide was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 74%. mp 243.5 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.57(s, 3H, N-CH₃) 8.05(d-d, 1H, H₃, J = 8.3, 4.4 Hz) 8.32(d, 1H, H₅, J = 9.0 Hz) 8.42(d, 1H, H₆, J = 9.0 Hz) 8.73(d-d, 1H, H₄, J = 8.3, 1.5 Hz) 9.02(d, 1H, H₁₀, J = 7.0 Hz) 9.28(d-d, 1H, H₂, J = 4.4, 1.5 Hz) 9.50(d, 1H, H₉, J = 7.0 Hz) 10.04(s, 1H, H₇).

Anal. Calcd for $C_{13}H_{11}N_2I$ (M.w. 322.16): N,8.70; C,48.46; H,3.44. Found: N,8.43; C,48.33; H,3.38.

7-Methyl-1,7-phenanthroline iodide was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 75%. mp 226.0 °C. 1H -NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.73(s, 3H, N-CH₃) 8.01(d-d, 1H, H₃, $J=8.1$, 4.4 Hz) 8.38(d-d, 1H, H₉, $J=8.4$, 5.9 Hz) 8.56(d, 1H, H₅, $J=9.5$ Hz) 8.76(d, 1H, H₆, $J=9.5$ Hz) 8.78(d-d, 1H, H₄, $J=8.1$, 1.8 Hz) 9.30(d-d, 1H, H₂, $J=4.4$, 1.8 Hz) 9.58(d, 1H, H₈, $J=5.9$ Hz) 10.24(d, 1H, H₁₀, $J=8.4$ Hz). Anal. Calcd for $C_{13}H_{11}N_2I$ (M.w. 322.158): N,8.70; C,48.46; H,3.44. Found: N,8.61; C,48.21; H,3.26.

5-Methylphenanthroline iodide was recrystallized from MeOH as yellow fine needles. The yield was 78%. mp 205.0-206.0 °C. 1H -NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.66(s, 3H, N-CH₃) 8.11(d-d-d, 1H, H₈, $J=7.9$, 7.0, 1.5 Hz) 8.14(d-d-d, 1H, H₃, $J=7.9$, 7.3, 1.5 Hz) 8.17(d-t, 1H, H₉, $J=7.0$, 1.5 Hz) 8.40(d-d-d, 1H, H₂, $J=7.9$, 7.3, 1.5 Hz) 8.55(d-d, 1H, H₁, $J=7.9$, 1.5 Hz) 8.56(d-d, 1H, H₁₀, $J=7.0$, 1.5 Hz) 9.15(d-d, 1H, H₇, $J=7.9$, 1.5 Hz) 9.19(d-d, 1H, H₄, $J=7.9$, 1.5 Hz) 10.30(s, 1H, H₆).

1-Methyl-benzo(f)quinoline iodide was recrystallized from MeOH as yellow needles. The yield was 92%. mp 206.5-207.5 °C. 1H -NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 4.70(s, 3H, N-CH₃) 8.00(m, 2H, H₆, H₇) 8.325(d, 1H, H₈, $J=8.4$ Hz) 8.332(d-d, 1H, H₃, $J=8.4$, 5.9 Hz) 8.42(d, 1H, H₉, $J=9.5$ Hz) 8.71(d, 1H, H₁₀, $J=9.5$ Hz) 9.13(d, 1H, H₅, $J=8.1$ Hz) 9.48(d, 1H, H₂, $J=5.9$ Hz) 10.11(d, 1H, H₄, $J=8.4$ Hz). Anal. Calcd for $C_{14}H_{12}NI$ (M.w. 321.168): N,4.36; C,52.35; H,3.77. Found: N,4.15; C,52.18; H,3.57.

2,2'-Dipyridyl (3.12 g, 20 mmol) and 1,2-dibromoethane (6 ml) were stirred at 110 °C for 16.5 hr. Pale green precipitate was filtered. Diquat dibromide (DQ²⁺) was recrystallized from MeOH as yellowish green needles. The yield was 41%. mp >250 °C (dec.). 1H -NMR (400 MHz; d_6 -DMSO) δ : 5.32(s, 4H, -CH₂CH₂-) 8.45(m, 2H, H₅)

8.95(d-t, 2H, H₄, *J* = 1.5, 8.1 Hz) 9.16(d, 2H, H₃, *J* = 8.1 Hz) 9.38(d, 2H, H₆, *J* = 5.9 Hz).

2,2'-Dipyridyl (3.12 g, 20 mmol) and 1,3-dibromopropane (15 g) were stirred at 160 °C for 6 hr. Pale green precipitate was filtered. Triquat dibromide was recrystallized from MeOH as yellow plates. The yield was 63%. mp >300 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 2.76(m, 2H, -CH₂CH₂CH₂-) 4.47(m, 2H, N-CH₂ax-) 5.02(m, 2H, N-CH₂eq-) 8.49(m, 4H, H₃, H₅) 8.94(t, 2H, H₄, *J* = 7 Hz) 9.37(d, 2H, H₆, *J* = 5.5 Hz).

Monoquat (2.98 g, 10 mmol) and 3-iodopropionic acid (5 eq) in DMF (50 ml) were stirred at 80 °C for 7 hr. Orange precipitate was filtered. 1-Methyl-1'-(2"-carboxy)ethyl-4,4'-dipyridinium diiodide was recrystallized from MeOH as glittering orange leaflets. The yield was 59%. mp 224 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 3.14(t, 2H, H₂', *J* = 6.6 Hz) 4.43(s, 3H, N-CH₃) 4.88(t, 2H, N-CH₂-, *J* = 6.6 Hz) 8.76(d, 2H, H₃, *J* = 7 Hz) 8.78(d, 2H, H₃', *J* = 7 Hz) 9.28(d, 2H, H₂, *J* = 7 Hz) 9.39(d, 2H, H₂', *J* = 7 Hz). IR 1740 cm⁻¹(C=O). Anal. Calcd for C₁₄H₁₆N₂O₂I₂ (M.w. 498.12): N,5.62; C,33.75; H,3.24. Found: N,5.37; C,34.01; H,3.22.

Monoquat (894 mg, 3.0 mmol) and 6-iodohexanoic acid (3.3 eq) in DMF (15 ml) were stirred at 60 °C for 5 hr. Ether was added to the reaction mixture, then red precipitate appeared was filtered. 1-Methyl-1'-(5"-carboxy)pentyl-4,4'-dipyridinium diiodide was recrystallized from MeOH as orange colored powder. The yield was 61%. mp 205 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 1.33(t, 2H, H₃", *J* = 7.5 Hz) 1.55(t, 2H, H₄", *J* = 7.5 Hz) 1.98(t, 2H, H₂", *J* = 7.5 Hz) 2.23(t, 2H, H₅", *J* = 7.5 Hz) 4.43(s, 3H, N-CH₃) 4.68(t, 2H, H₁", *J* = 7.5 Hz) 8.76(d, 2H, H₃, *J* = 7.5 Hz) 8.79(d, 2H, H₃', *J* = 7 Hz) 9.28(d, 2H, H₂, *J* = 7 Hz) 9.39(d, 2H, H₂', *J* = 7 Hz). IR 1730cm⁻¹(C=O). Anal. Calcd for C₁₇H₂₂N₂O₂I₂ (M.w. 540.20): N,5.19; C,37.80; H,4.11. Found: N,4.91; C,37.54; H,4.01.

1-Methylpyridinium iodide was recrystallized from EtOH as colorless powder. The yield was 78%. mp 106.0-108.0 °C (dec.). ¹H-NMR (60 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.4(s, 3H,

N-CH₃) 8.2(d-d, 2H, H₃, *J* =6 Hz) 8.7(d-d, 1H, H₄, *J* =6 Hz) 9.1(d, 2H, H₂, *J* =6 Hz).

Anal. Calcd for C₆H₈N₁ (M.w. 221.072): N,6.34; C,32.60; H,3.65. Found: N,; C,; H,.

1-Methylquinolinium bromide was recrystallized from EtOH as yellow needles. mp 135.0-137.0 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.63(s, 3H, N-CH₃) 8.06(d-d, 1H, H₆, *J* =7.0, 7.3 Hz) 8.17(d-d, 1H, H₃, *J* =5.5, 8.2 Hz) 8.29(d-d, 1H, H₇, *J* =7.3, 8.6 Hz) 8.48(d, 1H, H₅, *J* =7.0 Hz) 8.51(d, 1H, H₈, *J* =8.6 Hz) 9.27(d, 1H, H₄, *J* =8.2 Hz) 9.49(d, 1H, H₂, *J* =5.5 Hz).

2-Methylisoquinolinium bromide was recrystallized from MeOH as pale yellow needles. mp 161.0-162.0 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.46(s, 3H, N-CH₃) 8.06(d-d, 1H, H₇, *J* =7.0, 8.0 Hz) 8.25(d-d, 1H, H₆, *J* =7.3, 7.0 Hz) 8.34(d, 1H, H₅, *J* =7.3 Hz) 8.47(d, 1H, H₈, *J* =8.0 Hz) 8.56(d, 1H, H₄, *J* =7.0 Hz) 8.69(d, 1H, H₃, *J* =7.0 Hz) 9.99(s, 1H, H₁).

Monoquat (894 mg, 3.0 mmol) and benzyl iodide (1090 mg, 5.0 mmol) in MeOH (30 ml) were stirred at room temperature for 29.5 hr. Red precipitate was filtered. 1-Methyl-1'-benzyl-4,4'-dipyridinium diiodide (MBzV²⁺) was recrystallized from MeOH as red needles. The yield was 86%. mp >140 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.43(s, 3H, N-CH₃) 5.94(s, 2H, N-CH₂-) 7.48(m, 3H, H₃'', H₄'') 7.61(m, 2H, H₂'') 8.75(m, 4H, H₃, H₃') 9.27(m, 2H, H₂) 9.51(m, 2H, H₂'). Anal. Calcd for C₁₈H₁₈N₂I₂ (M.w. 516.18): N,5.43; C,41.88; H,3.52. Found: N,5.16; C,41.71; H,3.49.

To 4-carboxybenzylbromide (1.075 g, 5.0 mmol) and N-hydroxysuccinimide (1.1 eq) in DMF (10 ml), DCC (1.1 eq) in DMF (6 ml) was added dropwise below 5 °C. The reaction mixture was stirred below 5 °C for 60 min and then at room temperature for 11 hr. Colorless precipitate (DCU) was filtered off. After removal of organic solvent, the residue was purified with silica gel column chromatography (eluent; n-hexane/CH₂Cl₂, 1/1) and recrystallized from MeOH. 4-Bromomethylbenzoic acid N-succinimide ester was obtained as colorless needles. The yield was 62%. mp 162-164 °C. ¹H-NMR (400 MHz;

CDCl₃/TMS) δ : 2.91(s, 4H, H_{SUC}) 4.51(s, 2H, -CH₂Br) 7.54(d, 2H, H₃, $J=8.4$ Hz) 8.12(d, 2H, H₂, $J=8.4$ Hz). MS 313:311=1:1(M⁺). IR 1734, 1769 cm⁻¹(C=O).

Monoquat (894 mg, 3.0 mmol) and 4-Bromomethylbenzoic acid *N*-succinimide ester (936 mg, 3.0 mmol) in MeOH (30 ml) were stirred at 50 °C for 3 hr. Yellowish orange colored precipitate was filtered. 1-Methyl-1'-(4''-(*N*-succinimidylloxycarbonyl)phenyl)-methyl-4,4'-dipyridinium bromide iodide (for preparation of V²⁺-BSA conjugate) was recrystallized from EtOH/H₂O as brown powders. The yield was 14%. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ : 2.49(s, 4H, H_{SUC}) 4.02(s, 3H, N-CH₃) 5.69(s, 2H, N-CH₂-) 7.41(d, 2H, H₂'', $J=8$ Hz) 7.79(d, 2H, H₃'', $J=8$ Hz) 8.32(d, 2H, H₃, $J=6.4$ Hz) 8.40(d, 2H, H₃', $J=6.2$ Hz) 8.87(d, 2H, H₂, $J=6.4$ Hz) 9.10(d, 2H, H₂', $J=6.2$ Hz) .

1-Methyl-3-phenylpyridinium iodide was recrystallized from EtOH as colorless needles. The yield was 90%. mp 156.0-157.0 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ : 4.40(s, 3H, N-CH₃) 7.59(m, 3H, H₃', H₄') 7.89(d, 2H, H₂', $J=7.0$ Hz) 8.20(d-d, 1H, H₅, $J=8.1, 5.9$ Hz) 8.89(d, 1H, H₄, $J=8.1$ Hz) 8.95(d, 1H, H₆, $J=5.9$ Hz) 9.40(s, 1H, H₂). Anal. Calcd for C₁₂H₁₂N₁ (M.w. 297.148): N,4.71; C,48.50; H,4.07. Found: N,4.44; C,48.54; H,3.98.

1-Methyl-2-phenylpyridinium iodide was recrystallized from EtOH/hexane as colorless needles. The yield was 76%. mp 145.0-146.5 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ : 4.11(s, 3H, N-CH₃) 7.66(m, 5H, -Ph) 8.08(d, 1H, H₃, $J=8$ Hz) 8.15(d-d, 1H, H₅, $J=6.2$ Hz) 8.63(d-d, 1H, H₄, $J=8, 6.2$ Hz) 9.13(d, 1H, H₆, $J=6.2$ Hz). Anal. Calcd for C₁₂H₁₂N₁ (M.w. 297.148): N,4.71; C,48.50; H,4.07. Found: N,4.44; C,48.55; H,4.23.

1-Methyl-2-(2'-pyridyl)pyridinium iodide was recrystallized from EtOH as pale yellow needles. The yield was 32%. mp 151.5-153.0 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ : 4.25(s, 3H, N-CH₃) 7.71(d-d, 1H, H₅', $J=7.7, 4.8$ Hz) 7.93(d, 1H, H₃', $J=7.7$ Hz) 8.17(d-d, 1H, H₄', $J=7.7$ Hz) 8.22(d-d, 1H, H₅, $J=7.5, 5.9$ Hz) 8.25(d, 1H, H₃, $J=8.1$ Hz) 8.71(d-d, 1H, H₄, $J=8.1, 7.5$ Hz) 8.85(d, 1H, H₆', $J=4.8$ Hz) 9.16(d, 1H,

H₆, *J* = 5.9 Hz). Anal. Calcd for C₁₁H₁₁N₂I (M.w. 298.138): N,9.40; C,44.31; H,3.72. Found: N,9.23; C,44.38; H,3.52.

1,1'-Dimethyl-2,2'-dipyridinium diiodide was recrystallized from MeOH/H₂O as yellow plates. The yield was 29%. mp 255.5-257.0 °C (dec.). Tended to sublime. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.13(s, 6H, N-CH₃) 8.46(m, 4H, H₃, H₅) 8.88(d-d, 2H, H₄, *J* = 8 Hz) 9.39(d, 2H, H₆, *J* = 5.9 Hz). Anal. Calcd for C₁₂H₁₄N₂I₂ (M.w. 440.09): N,6.37; C,32.75; H,3.21. Found: N,6.10; C,32.75; H,3.01.

1-Methyl-4-(2'-pyridyl)pyridinium iodide was recrystallized from EtOH as yellow needles. The yield was 92%. mp 191.0-192.0 °C. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.36(s, 3H, N-CH₃) 7.67(d-d-d, 1H, H_{5'}, *J* = 7.7, 5.7, 1.1 Hz) 8.12(d-d-d, 1H, H_{4'}, *J* = 7.7, 1.8 Hz) 8.43(d-d, 1H, H_{3'}, *J* = 7.7, 1.1 Hz) 8.77(d, 2H, H₃, *J* = 7.0 Hz) 8.87(d-d, 1H, H_{6'}, *J* = 5.7, 1.8 Hz) 9.08(d, 2H, H₂, *J* = 7.0 Hz). Anal. Calcd for C₁₁H₁₁N₂I (M.w. 298.138): N,9.40; C,44.31; H,3.72. Found: N,9.17; C,44.19; H,3.42.

1,1'-Dimethyl-2,4'-dipyridinium diiodide was recrystallized from MeOH/H₂O as yellow needles. The yield was 31%. mp 216 °C (dec.). ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.15(s, 3H, N₁-CH₃) 4.47(s, 3H, N_{1'}-CH₃) 8.20(d, 1H, H₃, *J* = 8.1 Hz) 8.34(d-d, 1H, H₅, *J* = 7, 6.6 Hz) 8.45(d, 2H, H_{3'}, *J* = 6.6 Hz) 8.79(d-d, 1H, H₄, *J* = 8.1, 7 Hz) 9.27(d, 1H, H₆, *J* = 6.6 Hz) 9.30(d, 2H, H_{2'}, *J* = 6.6 Hz). Anal. Calcd for C₁₂H₁₄N₂I₂ (M.w. 440.09): N,6.37; C,32.75; H,3.21. Found: N,6.23; C,32.57; H,3.21.

Synthesis of Substrate for Antibody Catalysis

p-Nitrophenyl picolinate was synthesized according to the method of Sigman and Jorgensen¹¹⁷. To 2-carboxypyridine (1.23 g, 10 mmol) and *p*-nitrophenol (1.0 eq) in CHCl₃ (50 ml), DCC (1.0 eq) in CHCl₃ (50 ml) was added dropwise at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 21 hr. Colorless precipitate (DCU) was filtered off. After removal of organic solvent, the residue was recrystallized from MeOH with charcol. *p*-Nitrophenyl picolinate was obtained as colorless plates. The

yield was 25%. mp 145-153 °C [lit. 145-147 °C ¹¹⁷]. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 7.49(d, 2H, H₂', J=9.8 Hz) 7.63(d-d-d, 1H, H₅, J=7.7, 4.8, 1.1 Hz) 7.98(d-t, 1H, H₄, J=7.7, 1.8 Hz) 8.30(m, 1H, H₃) 8.50(d, 2H, H₃', J=9.8 Hz) 8.87(d-d, 1H, H₆, J=4.8, 1.8, 0.7 Hz).

Benzyloxypyridinium bromide was synthesized according to the method of Feely et al. ¹²⁰). Pyridine N-oxide (1.90 g, 20 mmol) and benzyl bromide (3.42 g, 20 mmol) were dissolved in 2 ml of CH₃CN and stirred at room temperature for 9 hr. Colorless precipitates were filtered and washed with ether. Benzyloxypyridinium bromide was obtained as colorless powders. The yield was 72%. mp 82-86 °C [lit. 94-96 °C ¹²⁰]. ¹H-NMR (400 MHz; d₆-DMSO) δ: 4.71(s, 1H, O-CH₂-) 5.73(s, 1H, O-CH₂-) 7.31-7.49(m, 5H, phenyl protons) 7.57(d-d, 1H, H₆, J=7.0, 2.2 Hz) 8.24-8.27(m, 2H, H₃, H₅) 8.64(t, 1H, H₄, J=7.7 Hz) 9.46(d-d, 1H, H₂, J=7.0, 1.1 Hz).

O-Acetylpyridine-4-aldoxime was synthesized according to the method of Ginsburg and Wilson ¹³⁰). Pyridine-4-aldoxime (1.22 g, 10 mmol) was dissolved in 10 ml of (CH₃CO)₂O by gently heating and the clear solution was stirred at room temperature for 20 hr. The reaction mixture was poured into 20 ml of ice cold water, neutralized by Na₂CO₃ and extracted with ether. The organic layer was dried with MgSO₄. After removal of ether, the residue was purified with silica gel column chromatography (eluent; CH₂Cl₂) and recrystallized from benzene/n-hexane. O-Acetylpyridine-4-aldoxime was obtained as colorless flakes. The yield was 35%. mp 96.0-98.5 °C [lit. 101-102 °C ¹³⁰]. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ: 2.26(s, 3H, -CH₃) 7.61(d, 2H, H₃, J=4.4 Hz) 8.34(s, 1H, -CH=N-) 8.73(d, 2H, H₂, J=4.4 Hz).

Measurement of Redox Potentials

Redox potentials of MPP⁺ derivatives (**1-10**), monoquat (**11**) and C₁C_n compounds (n=1-10) were measured in acetonitrile (CH₃CN) at 1 mM under an argon atmosphere with a Pt electrode, which included 0.1 M tetraethylammonium perchlorate (TEAP) as the

supporting electrolyte, using a Nikko Keisoku rotating ring-disk electrode RRDE-1, motor speed controller SC-5, potential sweeper NPS-2 and dual potentiogalvanostat DPGS-1. TEAP was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. The reference electrode was a saturated calomel electrode (SCE).

Redox potentials of C_1C_n compounds ($n=1-10$) were also measured in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 1 mM under argon atmosphere with glassy-carbon electrode, in the presence or absence of 10 mM α -cyclodextrin (α -CD).

Redox potentials of DQ^{2+} and $MBzV^{2+}$ were measured in PBS (pH 7.4) at 1 mM under argon atmosphere with glassy-carbon electrode. The values vs. SCE were corrected to the values vs. normal hydrogen electrode (NHE) by adding 241 mV at 25 °C.

Measurement of Superoxide Formation Using the Cyt. c Reduction Method

1). Section 1.

Escherichia coli (*E. coli*)B VB₁₂⁻, ATCC 29682 was used. It was cultured in Glucose Minimal (GM) medium which contained 0.02 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% citrate, 1.0% K_2HPO_4 , 0.35% $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$, 0.5% D-glucose and 1.0×10^{-3} % vitamin B₁₂ (VB₁₂) at 37 °C in a water bath shaker at 100 rpm with a ratio of flask volume to culture volume of 5:1, and growth was monitored with a Coleman Junior II spectrophotometer in terms of changes in turbidity at 600 nm, using a test tube (diameter 15 mm) attached to the flask. Cultures were grown until OD_{600} reached about 0.35 (mid log phase), then the cells were harvested at 13000xg for 15 min at 4 °C, washed three times with 15 ml of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), and suspended in 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.8).

The standard assay was performed in 3 ml of 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.8, containing 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in a 1.0 cm cuvette at 37 °C. The reaction mixture contained 10 μ M ferricytochrome *c* ($cyt.c^{3+}$), 187 μ M D-glucose and sufficient *E. coli* (usually 50 μ l of *E. coli* suspension prepared according to the method

mentioned above). Finally an MPP⁺ derivative (1-10), PQ²⁺ and monoquat (11) was added to the mixture and then O₂^{-•} formation was monitored at 550 nm by continuous measurement of cyt. *c* reduction, using a JASCO UV/VIS spectrophotometer. In order to confirm O₂^{-•} formation, 3000 units of superoxide dismutase (SOD) were added after cyt.*c*³⁺ addition. Ferricytochrome *c* was purchased from Sigma Chemical Co. SOD was obtained from Boehringer Mannheim GmbH.

2). Section 2.

E. coli B SR-9, which was kindly presented by Dr. Chevion (Israel), was used. Cell culture was almost the same as section 1. Cell was cultured in GM medium without VB₁₂. Instead of a Coleman Junior II spectrophotometer, an Erma photoelectric colorimeter AE-11N was used and growth was monitored with it in terms of changes in turbidity at 620 nm. Cultures were grown until OD₆₂₀ reached about 0.30 (mid log phase). The standard assay was the same as section 1, except that 60 units of SOD were added.

3). Section 3.

E. coli B VB₁₂⁻, ATCC 29682 was used. Cell was cultured in GM medium with 1.0x10⁻³% VB₁₂. The other method was the same as section 2 except compounds.

Inhibition of Growth of E. coli

E. coli was cultured according to the method described above. In section 2, YE medium was used instead of GM medium. YE medium contains GM medium plus Yeast Extract (100 mg/ml), which was obtained from Difco. Under aerobic conditions, *E. coli* was cultured in a water bath shaker at 100 rpm and cell density was measured at 620 nm with an Erma photoelectric colorimeter AE-11N. Under anaerobic conditions, *E. coli* was cultured stayed in an anaerobic chamber and cell density was measured at 600 nm with a Coleman Junior II spectrophotometer (section 1) and at 620 nm with an Erma photoelectric colorimeter AE-11N (section 2, 3).

Lethal Effect ⁸⁹⁾

Loss of viability was determined as follows. The incubation system (10 ml) contained 1×10^7 *E. coli* cells/ml and D-glucose (0.5% w/v) in 1.0 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). Viable cells were enumerated by spreading appropriate dilutions in duplicate on 1% bactotryptone (from Difco), 0.5% NaCl medium solidified with 2% agar (from Difco) and then counting colonies after 24 h of aerobic incubation at 37 °C.

Preparation of French Press Membranes ⁹⁰⁾

E. coli B SR-9 was cultured in 10 l of GM medium with 0.5% D-glucose at 37 °C in a Microferm Fermentor rotating at 400 rpm and flowing air at 12.5 l/min. Cultures were grown until OD₆₅₀ reached 0.7 (mid log phase), then the cells were harvested. French-press membranes were prepared as following protocol (Scheme M-1).

Measurement of Inhibitory Effect on Respiratory Chain of E. coli (SR-9)

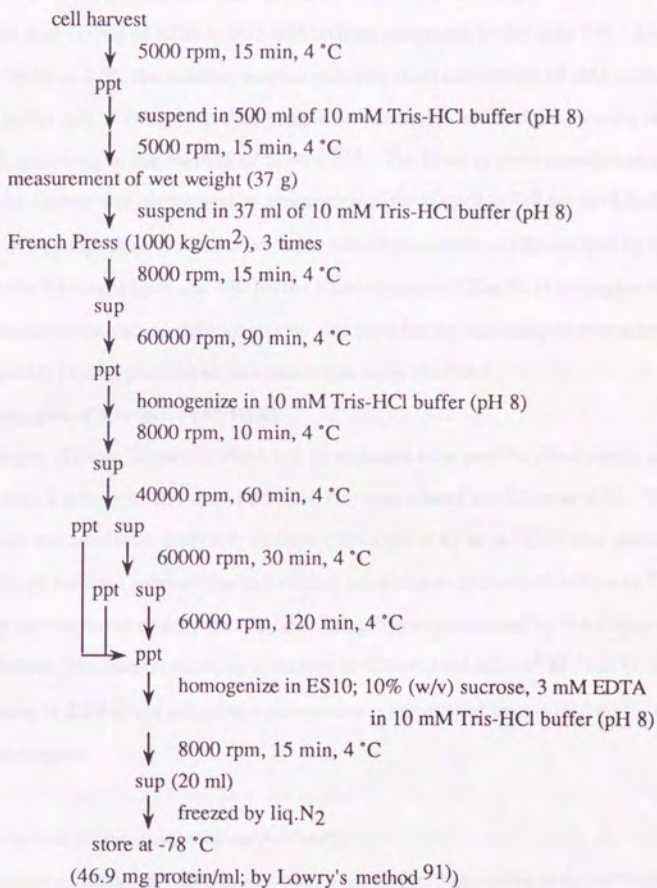
1). NADH Oxidation.

The standard assay was performed in 3 ml of 10 mM potassium phosphate buffer at pH 7.8 in a 1.0 cm cuvette at 37 °C. The reaction mixture contained sufficient French press membranes and compound to test. Finally NADH (100 µM) was added to the mixture and then NADH consumption was monitored at 340 nm, using a Shimadzu UV-visible recording spectrophotometer.

2). O₂ Consumption.

The standard assay was performed in 2 ml of 10 mM potassium phosphate buffer at pH 7.8 in a reaction cell at 37 °C. The reaction mixture contained 235 µg protein/ml French press membranes and compound to test. After coincubation for 10 min, NADH (0.75 mM) was added to the mixture and then O₂ was consumed. O₂ consumption was detected by Clark-type O₂ electrode.

Scheme M-1. Preparation of French Press Membranes



Preparation of Protein Conjugates

1). Bovine serum albumin (BSA) and keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugates of the Hapten.

A solution (400 μ l) of the Hapten (5 mg/ml) in water was added to a solution (2 ml) of 10 mg of BSA or 10 mg of KLH in 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). After stirring for 18 hr at 4 °C, the solution was exhaustively dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 4 °C. The protein concentration of the final solution was determined according to the method of Lowry⁹¹). The level of derivatization of the protein by the Hapten was determined by absorbance of the Hapten at 389 nm ($\epsilon=5.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). An epitope density of 12 haptens per protein monomer was determined by this method for the BSA conjugate and 460 for the KLH conjugate. The KLH conjugate was used for immunization and the BSA conjugate was used for the screening of monoclonal antibodies (mAbs) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

2). BSA conjugate of viologen (V^{2+} -BSA).

The viologen (12 mg; 20 μ mol), which has an activated ester part described above, and BSA (130 mg; 2 μ mol) in 20 ml of PBS (pH 7.4) was stirred for 32 hr at 4 °C. The solution was exhaustively dialyzed against PBS (pH 7.4) at 4 °C. The protein concentration of the final solution was determined according to the method of Lowry⁹¹). The level of derivatization of the protein by the viologen was determined by absorbance of the cation radical formation reduced by dithionite at 604 nm ($\epsilon=1.45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). An epitope density of 2.2 haptens per protein monomer was determined by this method for the V^{2+} -BSA conjugate.

Preparation of Anti-paraquat Monoclonal Antibodies

Anti-paraquat monoclonal antibodies (mAbs) were prepared according to the method of Inoue et al.¹¹⁰). Immunization was performed by intrasplenic injection. Briefly, 300 μ g of Hapten-KLH conjugate was absorbed on a nitrocellulose membrane (1.5x1.5 cm^2),

homogenized and suspended in 1.5 ml of saline. Then the antigen solution was injected into the spleen of BALB/c mouse (female, 8 wk old) through a 25-gauge butterfly needle. Three days after the final boost (2-wk interval), 1.29×10^8 spleen cells were fused with 1.61×10^7 X63-Ag8.6.5.3. mouse myeloma cells by treatment with 0.5 ml of 50% polyethylene glycol (PEG 4000; Merck) in DMEM for 1 min at 37 °C. DMEM (10 ml) and FCS (2 ml) was then added, the suspension was centrifuged at 800 rpm for 15 min and the cells were resuspended in HAT (hypoxanthine/aminopterin/thymidine) medium. The cells were grown in 96-well culture plates. Two weeks after the fusion, the supernatants of hybridomas were tested for production of anti-paraquat antibodies by ELISA. The positive cells were cloned by limiting dilution. The resulting 5 hybridomas were largely grown to obtain mAbs in the supernatants. The mAbs in the supernatants were purified by 50% ammonium sulfate precipitation followed by affinity chromatography on a protein A-Sepharose or a protein G-Sepharose column for IgGs and by gel-filtration column chromatography on TSK-GEL G4000SWXL for IgMs. The heavy chain class of the purified mAbs was determined by using biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulins specific to IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG3, and HRP conjugated streptavidine. The purified mAbs gave protein bands corresponding to heavy chain and light chain of IgG and IgM on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). They were dialyzed against phosphate buffer saline (PBS; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g in 1 l of H_2O ; pH 7.4) and stored at -20 °C before use. The protein concentration was determined according to the method of Lowry⁹¹).

Measurement of IC₅₀ Value by the Competition ELISA

The Hapten-BSA conjugate (10 ng/ml; 50 µl/well) in PBS (pH 7.4) was coated on microtiter plates (Immulon 2) for 8-12 hr at 4 °C. The plates were washed at 3 times by PBS supplemented with 0.05% Tween 20 (washing buffer). Then uncoated parts of each well were blocked with 3% BSA (200 µl/well) in 10 mM HEPES buffer saline (pH 7.4)

for 3 hr at room temperature and washed at 6 times with the washing buffer. The mAbs (100 ng/ml, as binding site concentration), which were coincubated with inhibitors at the concentrations serially diluted 2-fold in 1% BSA-PBS for 2 hr at room temperature, were transferred to the antigen coated plates (50 μ l/well) and incubated for 2 hr at room temperature. After removal of the solution and washing at 6 times with the washing buffer, a solution of biotinylated goat anti-mouse Igs in 1% BSA-PBS were treated at 50 μ l/well for 2 hr at room temperature. Then after washed at 6 times with the washing buffer, HRP conjugated streptavidin were treated at 50 μ l/well for 1 hr at room temperature. After washed at 6 times with the washing buffer, finally each well was treated with 100 μ l of a solution of *o*-phenylenediamine (0.4 mg/ml) in the reaction buffer (5.11 g of citric acid \cdot H₂O and 18.41 g of Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O in 1 l of H₂O) containing 0.015% H₂O₂, the yellow color was allowed to develop for approximately 10 min, and the addition of 50 μ l/well of 4 N H₂SO₄ was used to end the reaction. A titration curve was obtained by measuring the absorbance at 492 nm using a microtiter plate reader. IC₅₀ values were obtained by extrapolating the concentration which showed 50% inhibition.

Redox Titration Method ¹¹¹⁾

To a deaerated reaction mixture (2.0 ml) containing 3 μ M of DQ²⁺ and 3 μ M of viologens (V²⁺) in PBS (pH 7.4) thermostated at 25 °C, a small volume of dithionite solution (50 mM in 10 mM NaOHaq) was added. After the equilibrium was reached, each spectra were monitored using a Shimadzu UV-visible recording spectrophotometer. The redox potentials of V²⁺ were calculated according to *Nernst equation*.

Nernst equation.

$$2.303 RT/nF \log \frac{[DQ^{2+}_{ox}]}{[DQ^{2+}_{red}] + E_{1/2}(DQ^{2+})} =$$

$$2.303 RT/nF \log \frac{[V^{2+}_{ox}]}{[V^{2+}_{red}] + E_{1/2}(V^{2+})}$$

The following values were substituted to *Nernst equation* to obtain the redox potentials of V^{2+} , $R=8.31$ (J/mol·K), $T=298$ (K), $F=9.65 \times 10^4$ (c/mol), $E_{1/2}(DQ^{2+})=-365$ (mV vs. NHE). The test was performed at several times.

Assay of Antibody Catalysis

1). NADH-PMS⁺-Cyt.c³⁺ system.

UV kinetic measurements were determined using a Shimadzu UV-visible recording spectrophotometer. Velocities were determined spectrophotometrically by measuring the initial absorbance increase at 550 nm due to reduction of Cyt.c³⁺ ($\epsilon=2.1 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹). The reaction was initiated by NADH (f. 100 μ M) addition to the reaction mixture containing phenazine methosulfate (PMS⁺; 10 nM) and Cyt.c³⁺ (15 μ M) in PBS (pH 7.4) with or without mAbs, thermostatzed at 25 °C. NADH consumption was also monitored at 340 nm.

2). Hydrolysis of *p*-nitrophenylpicolinate.

UV kinetic measurements were determined using a Shimadzu UV-visible recording spectrophotometer. Velocities were determined spectrophotometrically by measuring the initial absorbance increase at 400 nm due to *p*-nitrophenol formation ($\epsilon=1.27 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹). The reaction was initiated by adding an appropriate volume of a stock solution (10 mM) of the substrate in CH₃CN to PBS (pH 7.4, total 500 μ l) with or without metals and/or mAbs, thermostatzed at 25 °C.

3). Aldehyde formation.

Pyridine and benzaldehyde formation were detected by HPLC using a JASCO PU980 pump (flow rate; 1.0 ml/min), JASCO UV970 detector (at 254 nm) and ODS column (eluent; H₂O/MeOH 75/25). The reaction was initiated by adding 100 μ l of a stock solution (10 mM) of the substrate in H₂O to 900 μ l of PBS (pH 7.4) with or without mAbs, thermostatzed at 37 °C. . The positive reaction was also performed in 1 N NaOHaq.

4). Degradation of O-acetylpyridine-4-aldoxime.

Pyridine-4-aldoxime and 4-cyanopyridine formation were detected by HPLC using a JASCO PU980 pump (flow rate; 1.0 ml/min), JASCO UV970 detector (at 270 nm) and ODS column (eluent; H₂O/MeOH 95/5 plus 0.05% triethylamine). The reaction was initiated by adding 100 μ l of a stock solution (10 mM) of the substrate in CH₃CN to 900 μ l of PBS (pH 7.4) with or without mAbs, thermostatyzed at 37 °C.

References

1. 八木國夫 中野稔 監修、二木鋭雄 島崎弘幸 編集「活性酸素 - 化学・生物学・医学 -」、医歯薬出版 (1987)
2. 「活性酸素 - 生物での生成・消去・作用の分子機構」、蛋白質核酸酵素臨時増刊 (共立出版) **33**, 2653-3188 (1988)
3. S.B.Farr and T.Kogoma, *Microbiol. Rev.*, **55**, 561-585 (1991)
4. J.A.Imlay and S.Linn, *Science*, **240**, 1302-1309 (1988)
5. 松中昭一、蛋白質核酸酵素、**33**, 2790-2794 (1988)
6. L.A.Summers, *J.Heterocyclic Chem.*, **28**, 827-842 (1991)
7. W.Sliwa, B.Bachowska and N.Zeichowicz, *Heterocycles*, **32**, 2241-2273 (1991)
8. J.A.Farrington, M.Ebert, E.J.Land and K.Fletcher, *Biochim.Biophys.Acta*, **314**, 372-381 (1973)
9. J.A.Farrington, M.Ebert and E.J.Land, *J.Chem.Soc. Faraday Trans. I*, **74**, 665-675 (1978)
10. H.M.Hassan and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **252**, 7667-7672 (1977)
11. H.M.Hassan and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **253**, 8143-8148 (1978)
12. H.M.Hassan and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **254**, 10846-10852 (1979)
13. J.Kitzler and I.Fridovich, *J.Bacteriol.*, **167**, 346-349 (1986)
14. J.W.Kitzler, H.Minakami and I.Fridovich, *J.Bacteriol.*, **172**, 686-690 (1990)
15. H.Minakami, J.W.Kitzler and I.Fridovich, *J.Bacteriol.*, **172**, 691-695 (1990)
16. H.Minakami and I.Fridovich, *Free Rad.Biol.Med.*, **8**, 387-391 (1990)
17. H.Minakami and I.Fridovich, *FASEB J.*, **4**, 3239-3244 (1990)
18. H.P.Misra and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **247**, 188-192 (1972)
19. H.M.Hassan and I.Fridovich, *Arch.Biochem.Biophys.*, **196**, 385-395 (1979)
20. H.Thor, M.T.Smith, P.Hartzell, G.Bellomo, S.A.Jewell and S.Orrenius, *J.Biol.Chem.*,

- 257, 12419-12425 (1982)
21. K.Öllinger and A.Brunmark, *J.Biol.Chem.*, **266**, 21496-21503 (1991)
 22. P.Camilleri, M.T.Clark, I.J.Gilmore and D.Cole-Hamilton, *J.Chem.Soc. Perkin Trans. II*, 833-836 (1985)
 23. P.Camilleri, J.R.Bowyer, M.T.Clark and P.O'Neill, *Biochim.Biophys.Acta*, **765**, 236-238 (1984)
 24. M.Takahashi, T.Nagano and M.Hirobe, *Arch.Biochem.Biophys.*, **268**, 137-143 (1989)
 25. T.Nagano, M.Takahashi and M.Hirobe, *Chem.Pharm.Bull.*, **39**, 1914-1916 (1991)
 26. T.Takabatake, M.Hasegawa, T.Nagano and M.Hirobe, *Chem.Pharm.Bull.*, **38**, 128-132 (1990)
 27. T.Takabatake, M.Hasegawa, T.Nagano and M.Hirobe, *Chem.Pharm.Bull.*, **39**, 1352-1354 (1991)
 28. T.Takabatake, M.Hasegawa, T.Nagano and M.Hirobe, *J.Biol.Chem.*, **267**, 4613-4618 (1992)
 29. I.A.Shaikh, F.Johnson and A.P.Grollman, *J.Med.Chem.*, **29**, 1329-1340 (1986)
 30. 木村優 著、「酸化還元反応とは何か」化学 One Point 20、共立出版 (1992)
 31. P.L.Dutton and D.F.Wilson, *Biochim.Biophys.Acta*, **346**, 165-212 (1974)
 32. S.J.Pollack, J.W.Jacobs and P.G.Schultz, *Science*, **234**, 1570-1573 (1986)
 33. A.Tramontano, K.D.Janda and R.A.Lerner, *Science*, **234**, 1566-1570 (1986)
 34. L.Pauling, *Am.Sci.*, **36**, 51 (1948)
 35. W.Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology* (McGraw-Hill, New York, 1969)
 36. Y.Arata, T.Nagano and A.Mitsumoto, *J.Synth.Org.Chem.Jpn.*, **48**, 482-493 (1990)
 37. R.A.Lerner, S.J.Benkovic and P.G.Schultz, *Science*, **252**, 659-667 (1991)
 38. K.M.Shokat, C.J.Leumann, R.Sugasawara and P.G.Schultz, *Nature*, **338**, 269-271 (1989)
 39. K.D.Janda, M.I.Weinhouse, D.M.Schloeder and R.A.Lerner, *J.Am.Chem.Soc.*, **112**,

1274-1275 (1990)

40. K.D.Janda, M.I.Weinhouse, T.Danon, K.A.Pacelli and D.M.Schloeder, *J.Am.Chem.Soc.*, **113**, 5427-5434 (1991)
41. D.Y.Jackson, J.W.Jacobs, R.Sugasawara, S.H.Reich, P.A.Bartlett and P.G.Schultz, *J.Am.Chem.Soc.*, **110**, 4841-4842 (1988)
42. D.Hilvert and K.D.Nared, *J.Am.Chem.Soc.*, **110**, 5593-5594 (1988)
43. D.Hilvert, S.H.Carpenter, K.D.Nared and M-T.M.Auditor, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **85**, 4953-4955 (1988)
44. D.Y.Jackson, M.N.Liang, P.A.Bartlett and P.G.Schultz, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **31**, 182-183 (1992)
45. C.Lewis, T.Krämer, S.Robinson and D.Hilvert, *Science*, **253**, 1019-1022 (1991)
46. C.F.Barbas III, J.D.Bain, D.M.Hoekstra and R.A.Lerner, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 4457-4461 (1992)
47. C.F.Barbas III, J.S.Rosenblum and R.A.Lerner, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90**, 6385-6389 (1993)
48. V.A.Roberts, B.L.Iverson, S.A.Iverson, S.J.Benkovic, R.A.Lerner, E.D.getzoff and J.A.Tainer, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 6654-6658 (1990)
49. A.Pessi, E.Bianchi, A.Cramer, S.Venturini, A.Tramontano and M.Sollazzo, *Nature*, **362**, 367-369 (1993)
50. J.D.Stewart, V.A.Roberts, M.W.Crowder, E.D.Getzoff and S.J.Benkovic, *J.Am.Chem.Soc.*, **116**, 415-416 (1994)
51. D.Hilvert, K.W.Hill, K.D.Nared and M-T.M.Auditor, *J.Am.Chem.Soc.*, **111**, 9261-9262 (1989)
52. A.C.Braisted and P.G.Schultz, *J.Am.Chem.Soc.*, **112**, 7430-7431 (1990)
53. V.E.Gouverneur, K.N.Houk, B.Pascual-Teresa, B.Beno, K.D.Janda and R.A.Lerner, *Science*, **262**, 204-208 (1993)

54. K.D.Janda, C.G.Shevlin and R.A.Lerner, *Science*, **259**, 490-493 (1993)
55. J.Na, K.N.Houk, C.G.Shevlin, K.D.Janda and R.A.Lerner, *J.Am.Chem.Soc.*, **115**, 8453-8454 (1993)
56. T.Kitazume, J.T.Lin, M.Takeda and T.Yamazaki, *J.Am.Chem.Soc.*, **113**, 2123-2126 (1991)
57. T.Kitazume, J.T.Lin, T.Yamamoto and T.Yamazaki, *J.Am.Chem.Soc.*, **113**, 8573-8575 (1991)
58. K.D.Janda, S.J.Benkovic and R.A.Lerner, *Science*, **244**, 437-440 (1989)
59. J-L.Reymond, J-L.Reber and R.A.Lerner, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **33**, 475-477 (1994)
60. M.R.Haynes, E.A.Stura, D.Hilvert and I.A.Wilson, *Science*, **263**, 646-652 (1994)
61. H.Miyashita, Y.Karaki, M.Kikuchi and I.Fujii, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90**, 5337-5340 (1993)
62. D.A.Campbell, B.Gong, L.M.Kochersperger, S.Yonkovich, M.A.Gallop and P.G.Schultz, *J.Am.Chem.Soc.*, **116**, 2165-2166 (1994)
63. S.Paul, D.J.Volle, C.M.Beach, D.R.Johnson, M.J.Powell and R.J.Massey, *Science*, **244**, 1158-1162 (1989)
64. S.Paul, M.Sun, R.Mody, H.K.Tewary, P.Stemmer, R.J.Massey, T.Gianferrara, S.Mehrotra, T.Dreyer, M.Meldal and A.Tramontano, *J.Biol.Chem.*, **267**, 13142-13145 (1992)
65. A.Mitsumoto, T.Nagano and M.Hirobe, *Arch.Biochem.Biophys.*, **296**, 482-488 (1992)
66. K.Chiba, A.Trevor and N.Castagnoli,Jr., *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **120**, 574-578 (1984)
67. M.Gerlach, P.Riederer, H.Przuntek and M.B.H.Youdim, *Eur.J.Pharmacol.*, **208**, 273-286 (1991)
68. J.W.Langston and I.Irwin, *Clin.Neuropharmacol.*, **9**, 485-507 (1986)

69. P.K.Arora, N.J.Riachi, G.C.Fiedler, M.P.Singh, F.Abdallah, S.I.Harik and L.M.Sayre, *Life Sci.*, **46**, 379-390 (1990)
70. J.N.Chacon, M.R.Chedekel, E.J.Land and T.G.Truscott, *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, **144**, 957-964 (1987)
71. J.H.Ross and R.I.Krieger, *J.Agric.Food Chem.*, **28**, 1026-1031 (1980)
72. A.Sion, A.Samuni and M.Chevion, *Biochem.Pharmacol.*, **38**, 3903-3907 (1989)
73. S.I.Liochev and I.Fridovich, *Free Rad.Biol.Med.*, **16**, 555-559 (1994)
74. S.I.Liochev, A.Hausladen, W.F.Beyer,Jr. and I.Fridovich, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**, 1328-1331 (1994)
75. S.I.Liochev and I.Fridovich, *Free Rad.Biol.Med.*, **16**, 29-33 (1994)
76. J.A.Imlay and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **266**, 6957-6965 (1991)
77. P.R.Gardner and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **266**, 1478-1483 (1991)
78. P.R.Gardner and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **267**, 8757-8763 (1992)
79. Z.Li and B.Demple, *J.Biol.Chem.*, **269**, 18371-18377 (1994)
80. S.I.Liochev and I.Fridovich, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 5892-5896 (1992)
81. J.H.Chou, J.T.Greenberg and B.Demple, *J.Bacteriol.*, **175**, 1026-1031 (1993)
82. E.Hasegawa, K.Takeshige, T.Oishi, Y.Murai and S.Minakami, *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, **170**, 1049-1055 (1990)
83. B.K.Sinha, Y.Singh and G.Krishna, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **135**, 583-588 (1986)
84. Y.Haskel, R.Udassin and M.Chevion, *Israel J.Med.Sci.*, **27**, 207-212 (1991)
85. Y.Haskel, R.Udassin and M.Chevion, *Free Rad.Res.Comms.*, **12-13**, 697-702 (1991)
86. D.M.Frank, P.K.Arora, J.L.Blumer and L.M.Sayre, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **147**, 1095-1104 (1986)
87. I.Ceballos, M.Lafon, F.Javoy-Agid, E.Hirsch, A.Nicole, P.M.Sinet and Y.Agid, *Lancet*, **335**, 1035-1036 (1990)

88. A.Mitsumoto, T.Nagano and M.Hirobe, *Oxygen Radicals*, K.Yagi et al. eds. (Elsevier) pp31-34 (1992)
89. P.Korbashi, R.Kohen, J.Katzhendler and M.Chevion, *J.Biol.Chem.*, **261**, 12472-12476 (1986)
90. M.Futai, *J.Membrane Biol.*, **15**, 15-28 (1974)
91. O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall, *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
92. 北潔、*生化学*、**62**, 417-433 (1990)
93. K.Takeshige and S.Minakami, *Biochem.J.*, **180**, 129-135 (1979)
94. R.R.Ramsay, A.T.Kowal, M.K.Johnson, J.I.Salach and T.P.Singer, *Arch.Biochem. Biophys.*, **259**, 645-649 (1987)
95. R.R.Ramsay, M.J.Krueger, S.K.Youngster, M.R.Gluck, J.E.Casida and T.P.Singer, *J.Neurochem.*, **56**, 1184-1190 (1991)
96. 矢木隆雄、蛋白質核酸酵素、**34**, 351-363 (1989)
97. 藤岡均、修士論文、東京大学薬学部薬品代謝化学教室
98. M.Kodaka and T.Fukaya, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **62**, 1154-1157 (1989)
99. 武藤信也 出口勝彦 目黒謙次郎、*化学の領域*、**28**, 325-334 (1974)
100. M.S.Rose, L.L.Smith and I.Wyatt, *Nature*, **252**, 314-315 (1974)
101. M.C.O'Sullivan, B.T.Golding, L.L.Smith and I.Wyatt, *Biochem.Pharm.*, **41**, 1839-1848 (1991)
102. N.Chen, M.R.Bowles and S.M.Pond, *Biochem.Pharm.*, **44**, 1029-1036 (1992)
103. S.M.Kao and H.M.Hassan, *J.Biol.Chem.*, **260**, 10478-10481 (1985)
104. K.Kashiwagi, N.Hosokawa, T.Furuchi, H.Kobayashi, C.Sasakawa, M.Yoshikawa and K.Igarashi, *J.Biol.Chem.*, **265**, 20893-20897 (1990)
105. K.W.Minton, H.Tabor and C.W.Tabor, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 2851-2855 (1990)

106. C.Altomare, P-A.Carrupt, N.E.Tayer, B.Testa and T.Nagatsu, *Helv.Chim.Acta*, **74**, 290-296 (1991)
107. D.A.Kleier and G.H.Weeks, *J.Mol.Struct. (Theochem)*, **148**, 25-31 (1986)
108. M.Mohammad, *J.Org.Chem.*, **52**, 2779-2782 (1987)
109. P.Kovacic, W.D.Edwards and G.Ming, *Free Rad.Res.Comms.*, **14**, 25-32 (1991)
110. M.Murakami, T.Kobayashi, M.Umeda, I.Kudo and K.Inoue, *J.Biochem.*, **104**, 884-888 (1988)
111. G.S.Wilson, *Methods in Enzymol.*, vol.LIV, pp396-410
112. S.G.Mayhew, *Eur.J.Biochem.*, **85**, 535-547 (1978)
113. J.M.McCord and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, **245**, 1374-1377 (1970)
114. F.G.Halaka, G.T.Babcock and J.L.Dye, *J.Biol.Chem.*, **257**, 1458-1461 (1982)
115. A.J.Boulton and A.McKillop, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, vol.2, pp7-8
116. A.Williams and G.Salvadori, *J.Chem.Soc. (B)*, 2401-2406 (1971)
117. D.S.Sigman and C.T.Jorgensen, *J.Am.Chem.Soc.*, **94**, 1724-1730 (1972)
118. T.H.Fife and T.J.Przystas, *J.Am.Chem.Soc.*, **107**, 1041-1047 (1985)
119. E.Ochiai, M.Katada and T.Naito, *J.Pharm.Soc.Japan*, **64**, 210-214 (1944)
120. W.Feely, W.L.Lehn and V.Boekelheide, *J.Org.Chem.*, **22**, 1135 (1957)
121. T.Cohen and I.H.Song, *J.Org.Chem.*, **31**, 3058-3060 (1966)
122. S.Mukaiyama, J.Inanaga and M.Yamaguchi, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **54**, 2221-2222 (1981)
123. J.M.Prokipcak and P.A.Forte, *Can.J.Chem.*, **49**, 1321-1322 (1971)
124. J.K.Chakrabarti and T.M.Hotten, *J.Chem.Soc. Chem.Commun.*, 1226-1227 (1972)
125. G.Rosini, G.Baccolini and S.Cacchi, *J.Org.Chem.*, **38**, 1060-1061 (1973)
126. G.Foley and D.R.Dalton, *J.Chem.Soc. Chem.Commun.*, 628-629 (1973)
127. R.Forsyth and F.L.Pyman, *J.Chem.Soc.*, 2912-2924 (1926)
128. H-H.Perkampus and G.Kassebeer, *Ann.Chem.*, **696**, 1-15 (1966)
129. F.L.M.Pattison, J.B.Stothers and R.G.Woolford, *J.Am.Chem.Soc.*, **78**, 2255-2259

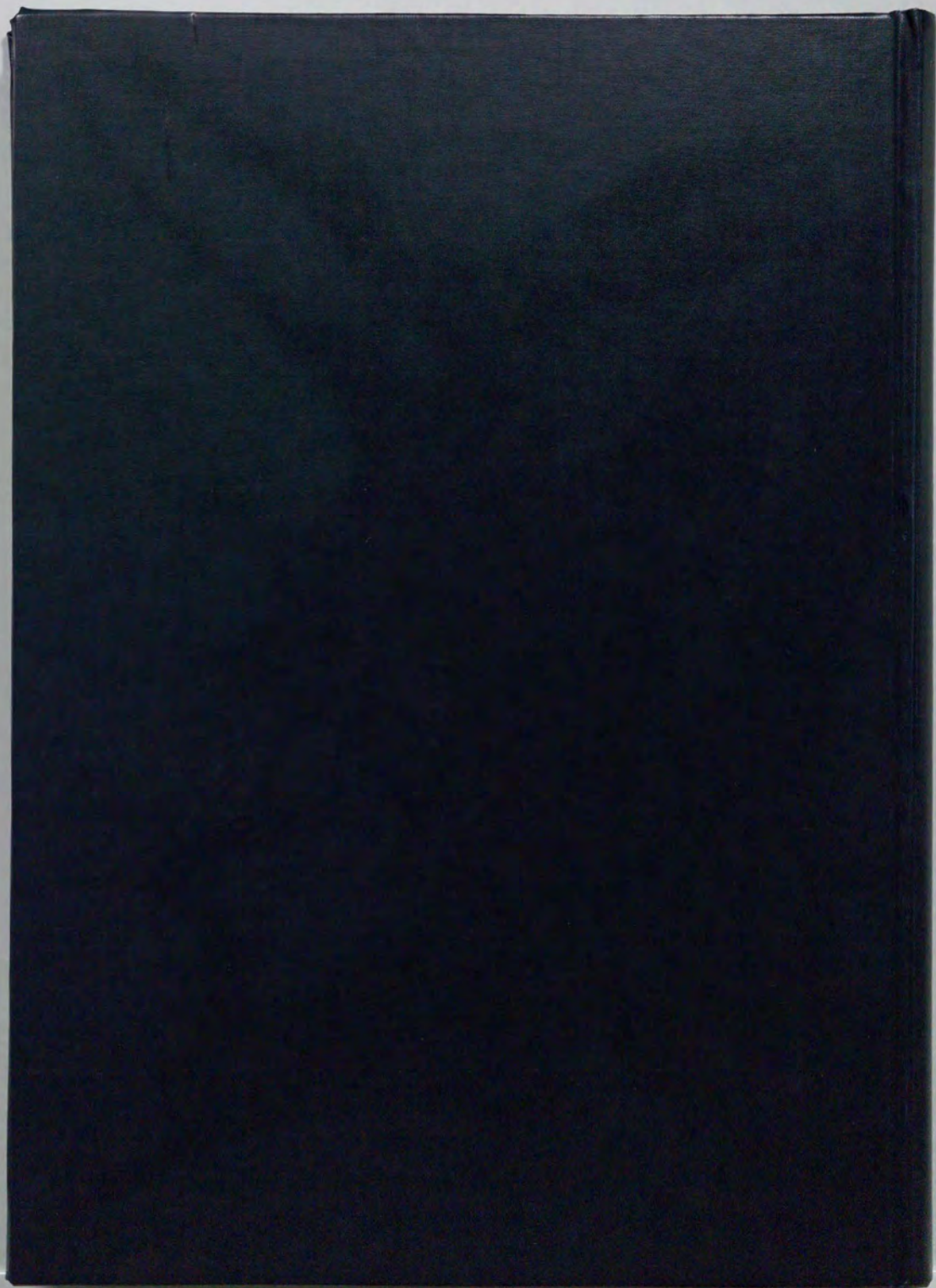
謝辞

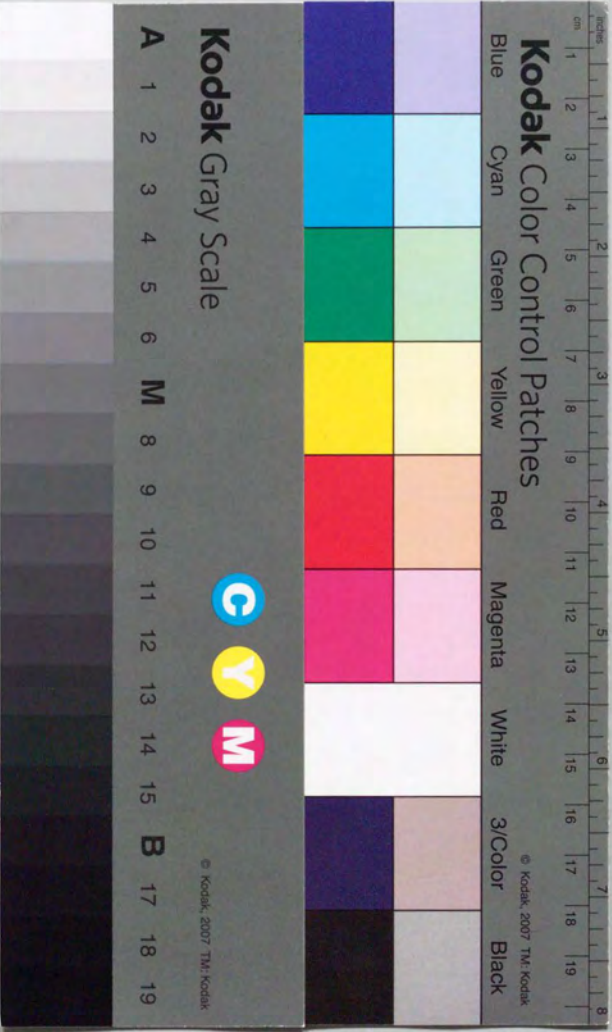
この研究を行うに当たりご指導くださいました、東京大学薬学部薬品代謝化学教室の
広部雅昭教授に深く感謝いたします。

実験および考察の過程において数多くの助言、励ましをいただきました長野哲雄助教
授をはじめとする同教室の先生方に深く感謝いたします。

実験を進めるうえで貴重な機器データを測定していただきました本学部中央分析室の
皆様に深く感謝いたします。

フレンチプレス膜の調製をご指導くださいました本学理学部安楽研の皆様、モノクロー
ナル抗体の調製をご指導くださいました本学部衛生裁判化学教室の皆様に深く感謝いた
します。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak